

①

バイオリアクターによる清酒の連続醸造

著者 本邦醸造技術の連続醸造法及び多量製法等研究

目次

1. 連続醸造法 10

2. 連続醸造法による清酒の連続醸造 12

3. 連続醸造法による清酒の連続醸造 12

4. 連続醸造法による清酒の連続醸造 12

5. 連続醸造法による清酒の連続醸造 12

6. 連続醸造法による清酒の連続醸造 12

7. 連続醸造法による清酒の連続醸造 12

8. 連続醸造法による清酒の連続醸造 12

著者 本邦醸造技術の連続醸造法及び多量製法等研究 **広常 正人**

発行所 本邦醸造技術の連続醸造法及び多量製法等研究

印刷所 本邦醸造技術の連続醸造法及び多量製法等研究

	目 次	
第 1 章	序 論	1
	文 献	6
第 2 章	米粉糖化液の連続醗酵における雑菌汚染対策	8
	実験方法	10
	実験結果と考察	12
	1. 連続醗酵条件の検討	12
	2. 製成酒の成分と官能評価	19
	要 約	23
	文 献	24
第 3 章	清酒の連続醸造と新規酒類の製造	25
	A. バイオリアクターによる清酒醸造の最適化	26
	実験方法	27

実験結果と考察	27
1. 原料白米の精米歩合の影響	27
2. バイオリアクターによる清酒の連続醸造	30
3. 連続醸造清酒の特長	33
4. バイオリアクターにおける遊離酵母の寄与	35
5. 前槽における溶存酸素の影響	39
6. バイオリアクターのスケールアップ	43
要約	44
B. しょうちゅうこうじを用いたみりんの製造	45
実験方法	45
実験結果	47
考察	51
要約	53
文献	54
第4章 清酒の連続醗酵に関する動力的検討	55
A. 固定化酵母と遊離酵母のアルコール生成速度式	57

実験材料と方法	57
実験結果と考察	60
1. 遊離酵母のモデルとシミュレーション	60
2. 拡散方程式とそのシミュレーション	65
3. 活性係数を導入した固定化菌体の速度式	71
4. 前槽付き連続醗酵槽のシミュレーション	74
5. 前槽付き連続醗酵装置の装置設計と運転条件	75
要約	80
記号	81
B. ニューラルネットワークによるアルコール醗酵プロセスの菌体濃度の同定	85
実験材料と方法	87
結果と考察	87
1. ニューロンシミュレーターの作成	87
2. ニューラルネットワーク (NN) の学習	92
3. NNを用いた菌体濃度のシミュレーション	93
4. シミュレーターのロバスト性の確認	97
5. 学習パターンのファジイ化によるロバスト性の向上	99

要 約	102
記 号	103
文 献	105
第 5 章 清酒の連続醗酵におけるオンライン制御	107
A. 質量流量計を使用したアルコール濃度のオンライン測定	108
実験材料と方法	110
結果と考察	113
1. アルコール濃度推定式	113
A. 回分醗酵槽	113
B. 前槽	114
C. 連続醗酵槽	117
2. 換算定数の同定方法	122
3. 前槽付き連続醗酵槽におけるオンライン測定	124
4. 攪拌を行わない場合の測定	128
要 約	130
記 号	131

B. 清酒連続醗酵システムのアルコール濃度のオンライン制御	132
実験材料と方法	133
結果と考察	141
1. 手動制御結果	141
2. オンライン制御結果	141
3. ファジイ学習則によるパラメータ推定	147
要約	153
記号	154
文献	156
第6章 総括	158
謝辞	161
公表論文	162

第 1 章

序 論

酒類醸造業界の最大懸案事項は、醸造工程の合理化による製造原価の低減と、新規な酒類の開発による酒類消費量の増大である。特に清酒業界においては、醸造工程の合理化に関して、製造原価の低減と共に、杜氏と呼ばれる熟練技能労働者の不足から、その醗酵工程の自動化が強く望まれている。また、近年、酒類全般の消費の流れが低アルコール化の傾向にあるため、吟醸酒や生酒を除いて、従来のタイプの清酒の消費量は頭打ちの状態にあり、消費量拡大のための新規な低アルコール清酒の開発が望まれている。

醸造工程の合理化の現状と問題点

まず、清酒醸造工程の合理化に関して、清酒の醸造法は、古来より変わることなく、酵母を培養した酒母に、蒸した白米と麴および水を加えて仕込み、約 20 日間にわたって並行複醗酵を行わせるものであった。近年でも、連続蒸米機や自動製麴機の導入など以前に比べて機械化が進んだとはいえ、醗の仕込や醗酵管理に関しては、依然として従来のままであり、その複雑さ故、熟練した技術者の経験や勘に頼る部分が多い。

この工程合理化に関して、最近の生体触媒の固定化技術の進歩にともない、

酵母を固定化したバイオリアクターにより、アルコールを連続的に生産する方法が研究^{1) 2) 3)}されており、実用化に近い段階に到っている。また、ビールやワインについても、固定化酵母を用いて連続醗酵を行う研究が試みられているが^{4) 5) 6)}、嗜好品である酒類の連続醗酵においては、長期間の連続運転にともなう雑菌汚染の対策法の確立が、解決すべき問題点として考えられている²⁾。すなわち、これら直接飲用に供される酒類においては、雑菌汚染に対する薬剤の使用等が行えないため、その解決策が強く望まれている。

さらに、清酒醸造分野においては、醸造形式が麴の酵素による糖化と酵母による醗酵が同時に進行する並行複醗酵であることと、醪が粒状の米や麴を含んだ半固体状であることから、バイオリアクターの導入は困難であると考えられていた⁷⁾。従って、これまでに報告されている、清酒の連続醸造に関する研究は、3～5槽のタンクにそれぞれ日数をずらして仕込を行い、順次醪を移動していく多槽方式が報告^{8) 9) 10)}されているにすぎない。

一方、従来の並行複醗酵式の清酒醸造法に対し、白米または蒸し米を麴で糖化したのち、圧搾濾過して得られる糖化液に酵母を添加して醗酵させる、いわゆる単行複醗酵式の醸造法が報告^{11) 12) 13)}されている。このような糖化工程と醗酵工程を分けた仕込においては、醗酵過程の管理や解析が比較的容易になるものと期待される。従って、この醸造法にバイオリアクターを導入して、醗酵工程を連続化することが可能となれば、清酒醸造工程の合理化が実現され、製造原価の低減につながるものと期待される。

バイオリアクター導入の問題点

工程の合理化のため、酒類の醸造工程にバイオリアクターを導入する際に、雑菌による汚染の問題の他に、もう一つの問題点として、バイオリアクターにより得られる酒類の品質が、従来の伝統的な製法により得られる酒類の品質と異なる場合が多いという問題がある。しかし、従来の製品の品質と同じものが得られたとしても、酒類における消費者心理は、伝統的なものを好む保守的傾向（清酒においては、いわゆる手造り指向、本物指向など）があり、この観点からバイオリアクターにより製造された酒類は、消費者からは敬遠される可能性が考えられる。すなわち、メーカーとして従来の酒類と全く同じ製品をバイオリアクターにより製造することの意義は大きいが、消費者側の観点に立てばその意義は少ないものと考えられる。

この問題の存在が、酒類醸造にバイオリアクターを導入する方法の実用化を遅らせている大きな原因であった。

新規な酒類の開発の現状

近年、酒類全体の消費量は僅かながら増加傾向にあるが、吟醸酒や生酒など個性化した清酒を除き、従来のタイプの清酒の消費量は、1975年をピークとして減少傾向にある。その原因としては、様々な要因があげられるが、酒類のソフト化が世界的な傾向にあるため、清酒のアルコール濃度（15～20%）が高すぎると感じられ始めたことが第1の原因と考えられている¹⁴⁾。

通常の方法で醸造した清酒を単に希釈しただけでは、香味の調和が崩れてしまうため、これまでも様々な方法による、多様化清酒、特に低アルコール清酒の開発が試みられてきた^{15)・16)}。すなわち、仕込水の大量添加、醗酵能の弱い酵母の使用、非醗酵性糖の割合増加、あるいは、物理的手段で生成したアルコールを除くなどである。それらの酒質は、2群に分けられ、1群は、従来の清酒の香味をそのまま基調とした酒で、2群は、新しい香味を持つ酒である¹⁴⁾。後者のなかでも、醗酵形式を前述の、ビール醸造と同様な、糖化工程の後に醗酵工程を行う単行複醗酵方式の清酒醸造法に変更する方法は、得られる清酒の香気成分が従来の清酒に比較して高いことが報告されており、新規な低アルコール清酒の開発法として、注目され始めている^{12)・13)}。従って、この醸造法に、バイオリクターを導入することが可能となれば、合理化された工程による、製造原価の低減された、香りの高い新規なタイプの低アルコール清酒を製造することが可能となるものと期待される。

以上の、清酒醸造分野における、醸造工程の合理化とバイオリクターの導入、及び新規な酒類の開発に関する技術的現状と問題点から、単行複醗酵式の清酒醸造法にバイオリクターを導入する技術を開発することは、醸造工程の合理化と新規な酒類の開発という懸案事項を解決する一つ的手段であると考えられる。すなわち、バイオリクターの導入という、新しい製法により得られた新品質の製品を開発する事により、清酒の新規需要層の開拓が図られるものと期待される。

醱酵工程自動化の現状

醱酵工程の自動化すなわち微生物反応のプロセス制御に関して、コンピューター産業の発展にともなうハードウェアの価格低下とともに、その研究報告は数多くなされている。清酒醸造という限定された分野に限ってみても、布川¹⁷⁾の研究を始め、杉本ら^{18, 19)}の総括的研究、佐藤ら^{20, 21)}の研究、また最近では土屋ら^{22, 23)}、大石ら²⁴⁾のファジイ制御を応用した研究などがある。これらの研究は、従来の並行複醱酵式の清酒醸造に関するものであり、根本的背景として、杜氏と呼ばれる熟練技能労働者の人手不足にともなう、醸造工程の省力化と高効率化が横たわっていることはどの著者も述べている。

従って、前述の、醸造工程の合理化による製造原価の低減と新規な酒類の開発を目的とした、バイオリアクターによる清酒の連続醸造においても、省力化や高効率化のために、導入したバイオリアクターをオンライン制御することは、最も望まれるべき将来の姿であると考えられる。

本研究は、このような背景のもとで、バイオリアクターの導入による清酒醸造工程の自動化、並びに新品質の製品開発の可能性を検討したものである。

文献

- 1) Wada, M., Kato, J., Chibata, I.: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 275 (1980)
- 2) 森川 康 : 微生物, 2, 28 (1986)
- 3) 花井四郎 : エネルギー 資源, 7, 62 (1986)
- 4) 戸塚昭、原 昌道、大塚謙一 : 特許公告, 昭 56-31111
- 5) 中西弘一、尾中俊夫、井上 喬 : 特許公開, 昭 61-58573
- 6) 熊田順一、須田幹夫 : *Bio Industry*, 3, 13 (1986)
- 7) 清酒酵母研究会編 : 「改訂 清酒酵母の研究」 日本醸造協会, p319-366 (1980)
- 8) 原 昌道、大塚謙一 : 醗工, 45, 289 (1967)
- 9) 本杉正義、石川正人 : 醗工, 45, 954 (1967)
- 10) 川原田肇、林田晋策、蒲池 励、加藤百一、本江元吉 : 醗工, 46, 921 (1968)
- 11) 今安 聰, 杉並孝二, 森 国彦 ; 昭和 43 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p47 (1968)
- 12) 秋田 修, 大場俊輝, 中村欽一 ; 醸協, 81, (6) 396 (1986)
- 13) 仲田富士男, 浜地正昭, 本馬健光 ; 醗工, 65, 179 (1987)
- 14) 吉沢 潔 : 醸協, 80, (5) 298 (1985)
- 15) 大塚謙一 : 「清酒製造技術」 日本醸造協会, p380-390 (1979)
- 16) 布川彌太郎、椎木 敏、齊藤和夫、矢野善嗣 : 醸協, 77, (1) 53 (1982)

- 17) 布川 彌太郎 : 醱酵工学, 58, 391-398 (1980)
- 18) Sugimoto, Y., Tanaka, N., Furukawa, A., Watanabe, K., Yosida, T., Taguchi, H.,
: *J. Ferment. Technol.*, 64, 187-197 (1986)
- 19) 杉本 芳範、藤田 栄信 : 醱酵工学, 65, 199-215 (1987)
- 20) 佐藤 和夫、宇都宮 仁、近藤 恭一、三島 秀夫、竹村 成三、中村 欽一、吉沢 潔
: 醱酵工学, 66, 91-97 (1988)
- 21) 佐藤 和夫、宇都宮 仁、近藤 恭一、三島 秀夫、竹村 成三、吉沢 潔 : 醱酵工学,
68, 25-29 (1990)
- 22) 土屋 義信、小泉 淳一、末成 和夫、手島 義春、永井 史郎 : 醱酵工学, 68, 123
-129 (1990)
- 23) 末成 和夫、土屋 義信、手島 義春、小泉 淳一、永井 史郎 : 醱酵工学, 68, 131
-136 (1990)
- 24) 大石 薫、富永 光則、川戸 章嗣、安部 康久、今安 聰 : 日本醱酵工学会大会講
演要旨集, p. 66 (1990)

第 2 章

米粉糖化液の連続発酵における雑菌汚染対策

第 1 章では、清酒醸造の技術的現状を分析し、これにバイオリアクターを導入することの意義、および、関連する当面の問題点を考察した。その要点は、①バイオリアクターの導入による工程の合理化と製造原価の低減が望まれているが、従来の清酒醸造の工程が、半固体状の醪を用いる並行複醗酵であるため、バイオリアクターの導入が困難と考えられたこと、②酒類におけるバイオリアクターの導入においては、雑菌汚染に対する対策が困難であること③従来型の清酒では、生産性を上げて消費量の拡大には必ずしもつながらないと考えられること、等のために実用化が遅れていた。④清酒醸造業界においては、新規な酒類（特に、低アルコール清酒）の開発による、酒類消費量の増大が望まれていることを示した。

以上の観点から、本研究では、清酒醸造にバイオリアクターを導入する方法として、糖化と醗酵を分けた、単行複醗酵式の清酒醸造の醗酵過程を、固定化酵母を用いて連続化する方法を確立し、清酒醸造工程の自動化を実現すること、並びに、この新しい方法を用いた新品質の製品開発の可能性を検討することを目的とした。

そこで、第 2 章では、まず、清酒醸造へのバイオリアクターの導入に不可欠

な、雑菌汚染対策の確立を目指して、検討を行った。すなわち、本章では、単行複醗酵式の清酒醸造法のモデル系として、米粉（いわゆる、白糠）糖化液のアルコール醗酵系を採用し、実験室規模の試験装置を用いて、固定化酵母による米粉糖化液の連続醗酵を行い、その際の雑菌による汚染の対策方法を検討した。

醗酵液を蒸留して得られる焼酎やウィスキーと異なり、醗酵液が直接飲用に供されるワインやビール等の酒類の連続醗酵においては、長期間の運転にともなう雑菌汚染対策として薬剤等の添加が行えないため、これらの解決策が強く望まれている¹⁾。一般的に、細菌による汚染の対策としては、原料糖液の加熱殺菌や、pHを低くするための酸の添加が行われる。さらに、野生酵母による汚染の対策として、キラー酵母の使用が報告^{2), 3)}されている。本章においても、野生酵母対策として、清酒酵母にキラー活性を導入した酵母を造成して使用した。

本章では、連続醗酵期間中の細菌による汚染の対策方法として、米粉糖化液の加熱殺菌やpH調整の影響について検討を加え、さらに雑菌汚染に対して十分に抵抗できるシステムの確立を目指した。

実験方法

1. 米粉糖化液の調製方法

連続発酵の原料糖化液には、米粉（白糠）を液化して得られる米粉糖化液と麴糖化液とを混合したものをを用いた。米粉糖化の方法は、次に示す通りである。すなわち、50℃、0.28%塩化カルシウム水溶液（汲水歩合250%）に、米粉と米粉重量の0.04%のコクゲン（大和化成KK製）及び0.01%プロテアーゼM「アマノ」（天野製薬KK製）を加え、50℃、4時間攪拌しながら保持、その後、57℃に急冷し、更に、米粉重量の0.05%のグルコアミラーゼ「アマノ」（天野製薬KK製）を加えて、57℃、14時間の糖化を行った。麴の糖化は、麴に汲水歩合250%の水を加えて、56℃、16時間糖化を行った。米粉、麴とも糖化終了後、遠心分離（8,000 r p m）を行い、上澄液を原料の米糖化液とした。麴糖化液は、麴歩合25%となるように、米粉糖化液と混合し実験に供した。この原料の米糖化液の成分は、直糖分20～21%、酸度0.5～1.0ml、アミノ酸度1.0～1.5mlであった。

2. 固定化酵母の調製法

酵母は、西谷らの方法⁴⁾により育種したK₁キラー協会10号酵母を使用した。酵母の固定化は、3%アルギン酸ナトリウム水溶液を121℃、5分間オートクレーブで溶解し、40℃前後に冷却後、1/10容量の上記キラー10号酵母の麴汁培養液

と混合したものを注射針（27G）付きのシリンジから、2%塩化カルシウム水溶液中に滴下して行った。この固定化酵母のビーズの直径は1.8~2.0mmであった。

3. バッチ（回分）式発酵方法

連続発酵の対照として、同じ糖化液を用いたバッチ式の仕込を行った。すなわち、pH4.0に調整した米糖化液100mlにキラー10号酵母を、初発菌数として 2×10^8 cells/mlの割合で添加し20℃で発酵させ、1日後と2日後にそれぞれ、250ml（pH4.0）の糖化液を追加し、更に1週間静置発酵を行った。

4. 連続発酵方法

固定化ゲル100mlを250ml容量の円筒形、ジャケット付きガラスカラム（5cm×20cm）に充填し、ペリスタポンプ（東京理科器械KK製）を用いて、カラム下部より原料糖化液を固定化酵母ゲル当たりSV=0.1となるように、一定流速で通液した。固定化酵母カラムの温度は、15℃または20℃とした。

5. 分析方法

一般成分、酵母数及びTTC染色率の測定は国税庁所定分析法注解⁵⁾によった。香気成分は、吉沢らのヘッドスペース法⁶⁾により、ガスクロマトグラフィーを用いて測定した。製成酒の官能評価は、パネル5名で行い、香り及び酒質について、1（良い）~5（悪い）の5点法で評価し、その平均値で示した。

実験結果と考察

1. 連続発酵条件の検討

(1) 糖化液の殺菌及びカラム温度の影響

未殺菌のpH4.0に調整した糖化液を、15℃の発酵温度で通液した場合には、細菌汚染のため酸度は徐々に増加した。それに対して、沸騰水浴中で15分間煮沸殺菌した糖化液を用いた場合には、発酵温度15℃及び20℃のいずれの場合も酸度は上昇せず一定していた。アルコールの生成は、15℃で7～8%、20℃では8～9%となり、カラム2連とすると、9～10%となった(Fig. 1)。

(2) 前槽の設置とアルコール濃度の影響

上の結果から、連続発酵中の汚染を防ぐためには、糖化液をpH4.0に調整しても、煮沸操作などの殺菌を行ってフィードする必要がある。しかし、毎回殺菌した糖化液を長期間にわたって通液することは、実地醸造を想定した場合、労力、設備及びコストの面からも不利な条件と考えられる。その上、糖化液の製造は、回分式に行われるため、連続発酵に移すまでの糖化液の汚染防止の施策も必要になるものと考えられる。

このような観点から、固定化酵母カラムの前に、糖化液を貯蔵しておく前槽を設け、更に、汚染防止のために前槽中においても発酵を行わせる方式を試みた。

すなわち、15℃において糖化液をいれた500mlまたは1L容のフラスコと固定化酵母カラムとを接続し、糖化液を2～5日間循環させた。前槽及びカラム中において、アルコールが生成されるとともに、固定化酵母ゲルより遊離した酵母が増殖してくるので、この時点よりカラム温度を20℃とし、以後は連続的に発酵液を溶出させ、1日に1度、減少したと同じ量の糖化液を前槽に添加した。

まず前槽中のアルコール濃度の影響を調べた。前槽の液量を350mlとし、2日間循環させた場合は、連続運転中、前槽のアルコール分は平均3%となった。

(平均とは、原料糖化液を補充する前と、補充後のアルコール分の平均値を示す。)前槽の液量を550mlとし、3日間循環させた場合は、前槽のアルコール分の平均は4～5%に、同様に、前槽液量を750mlとし、5日間循環させた場合は、平均6～7%となった。

前槽のアルコール分を平均3%とした場合、溶出液の酸度が徐々に上昇したが、平均4%以上の場合には、酸度上昇はなく安定していた。また、溶出液のアルコール分は、11～12%となった。(Fig.2)

(以後、このように反復回分式の前槽と固定化酵母カラムとを接続して連続発酵を行う方法を、前槽方式と仮称する。)

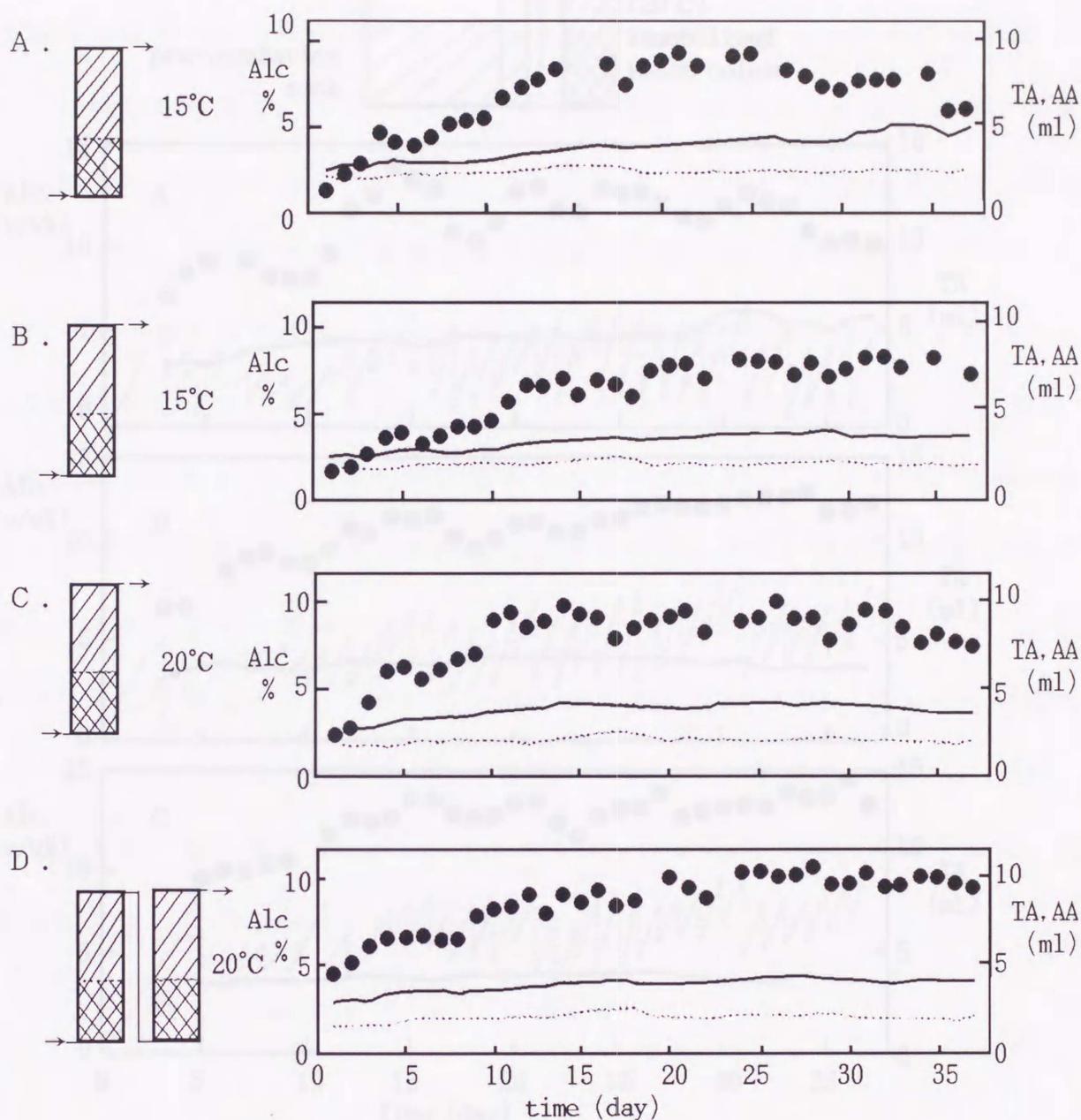


Fig. 1 Effect of sterilization of saccharified solution and column temperature on alcohol concentration and total acidity of effluent from the reactor.

A, using non-sterilized solution; B, C, D, using sterilized solution.
 Symbols: ●, alcohol concentration (v/v%); The solid line shows total acidity(ml).
 The dotted line shows amino acidity(ml).

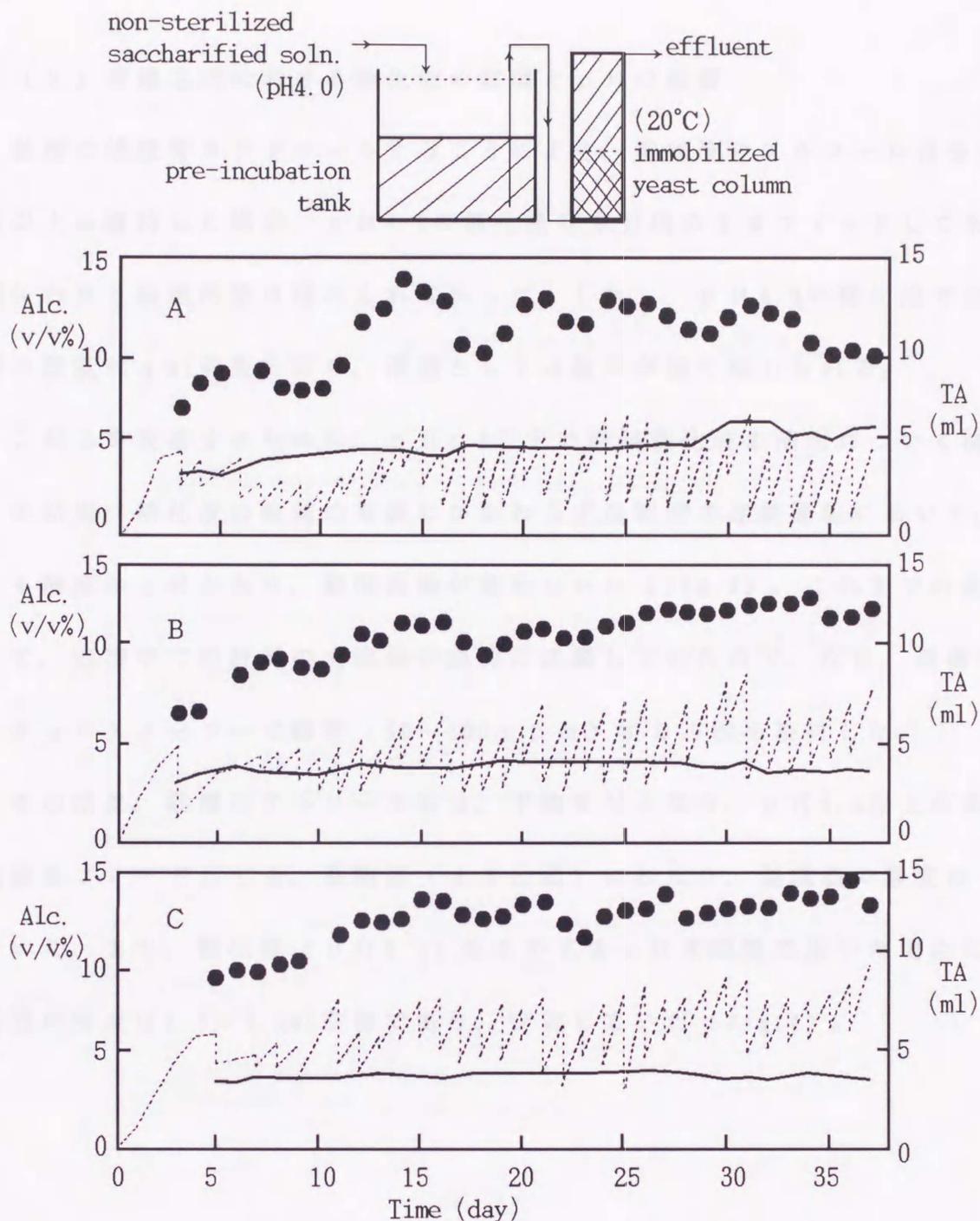


Fig. 2 Effect of alcohol concentration of pre-incubated solution on the total acidity of effluent from the reactor.

In A, B, and C, the mean alcohol concentration of the pre-incubated solution was 3, 5, and 7 (v/v%), respectively. Symbols: ●, alcohol concentration (v/v%) of the effluent from the reactor. The solid line shows total acidity (ml) of the effluent. The dotted line shows alcohol concentration (v/v%) of the pre-incubated solution.

(3) 前槽方式における糖化液の殺菌とpHの影響

前槽の液量をコントロールすることにより、前槽液のアルコール分を平均4%以上に維持した場合、pH4.0の糖化液は未殺菌のままフィードしても、長期間にわたり細菌汚染は認められなかった。しかし、pH4.0の糖化液では、製成酒の酸度は4ml前後となり、清酒としては酸味が強く感じられる。

これらを改善するために、pH4.5以上の原料糖化液の使用について検討した。その結果、糖化液の殺菌の有無にかかわらず長期間の連続運転において、両者とも酸度の上昇があり、細菌汚染が認められた (Fig.3)。これまでの実験において、前槽中での酵母の大部分が底部に沈澱していたので、次に、前槽をマグネチックスターラーで攪拌 (50~100rpm) する方法を検討した。

その結果、前槽のアルコール分は、平均6%となり、pH4.5以上の未殺菌糖化液をフィードしても、長期間 (45日間) にわたり、製成酒の酸度は一定していた。また、糖化液 (pH5.5) をそのままpH未調整で用いた場合には、製成酒の酸度は2.0~2.5ml前後であり、安定していた (Fig.4)。



Fig. 4. Effect of aeration and pH of unsterilized solution on the acidity of saké. (a) aerated solution having pH 4.5, (b) unsterilized solution having pH 4.5, and (c) unsterilized solution having pH 5.5. Results are the mean of 10 trials.

sterilized or non-sterilized soln.
(pH4.5 or pH 5.5)

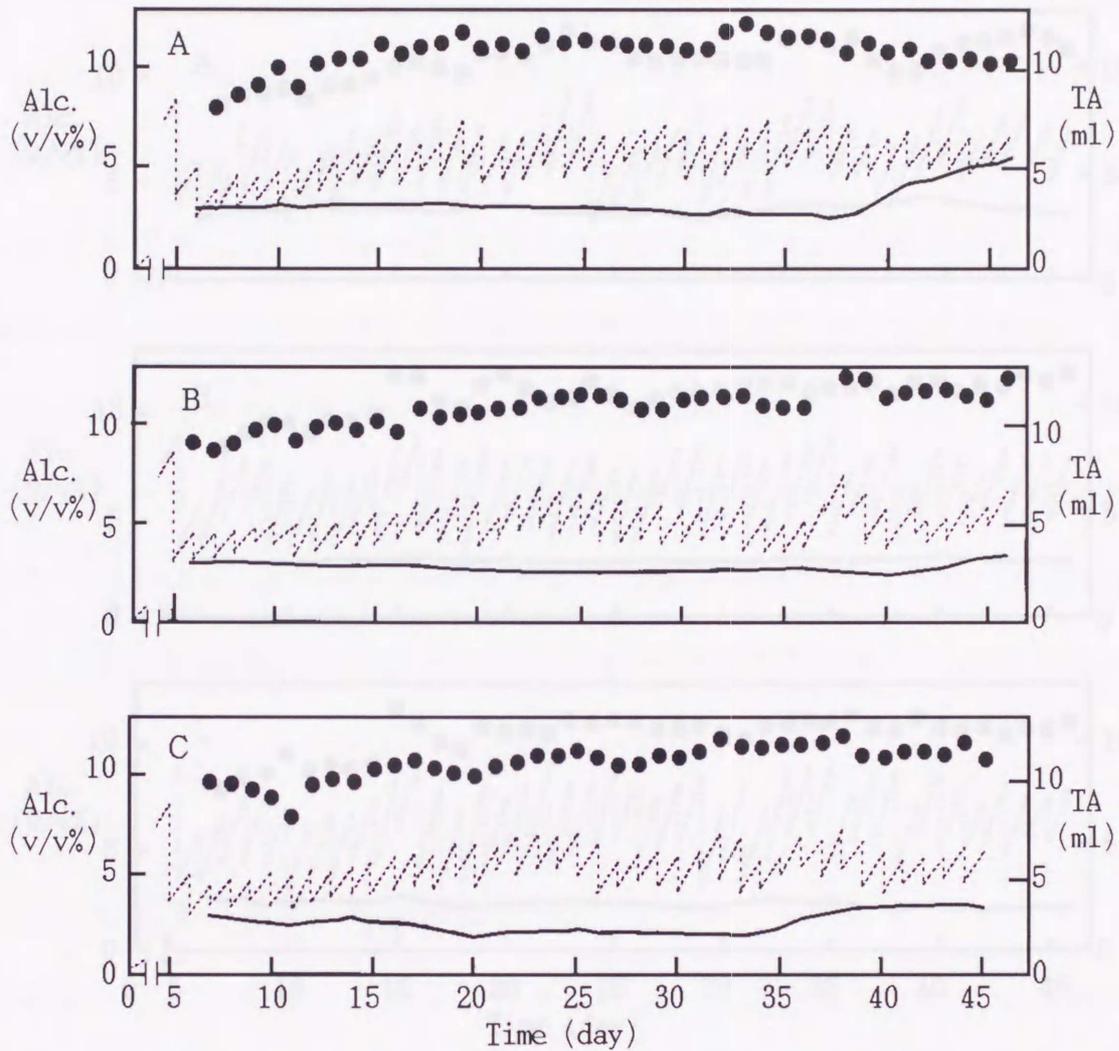
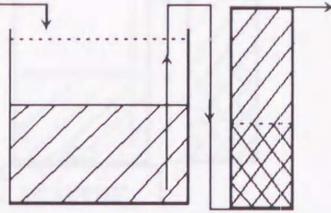


Fig. 3 Effect of sterilization and pH of saccharified solution on the total acidity of effluent from the reactor.

In A, B, and C, non-sterilized solution having pH4.5, sterilized solution having pH4.5, and sterilized solution having pH5.5 were used, respectively. Symbols are the same as in Fig. 2.

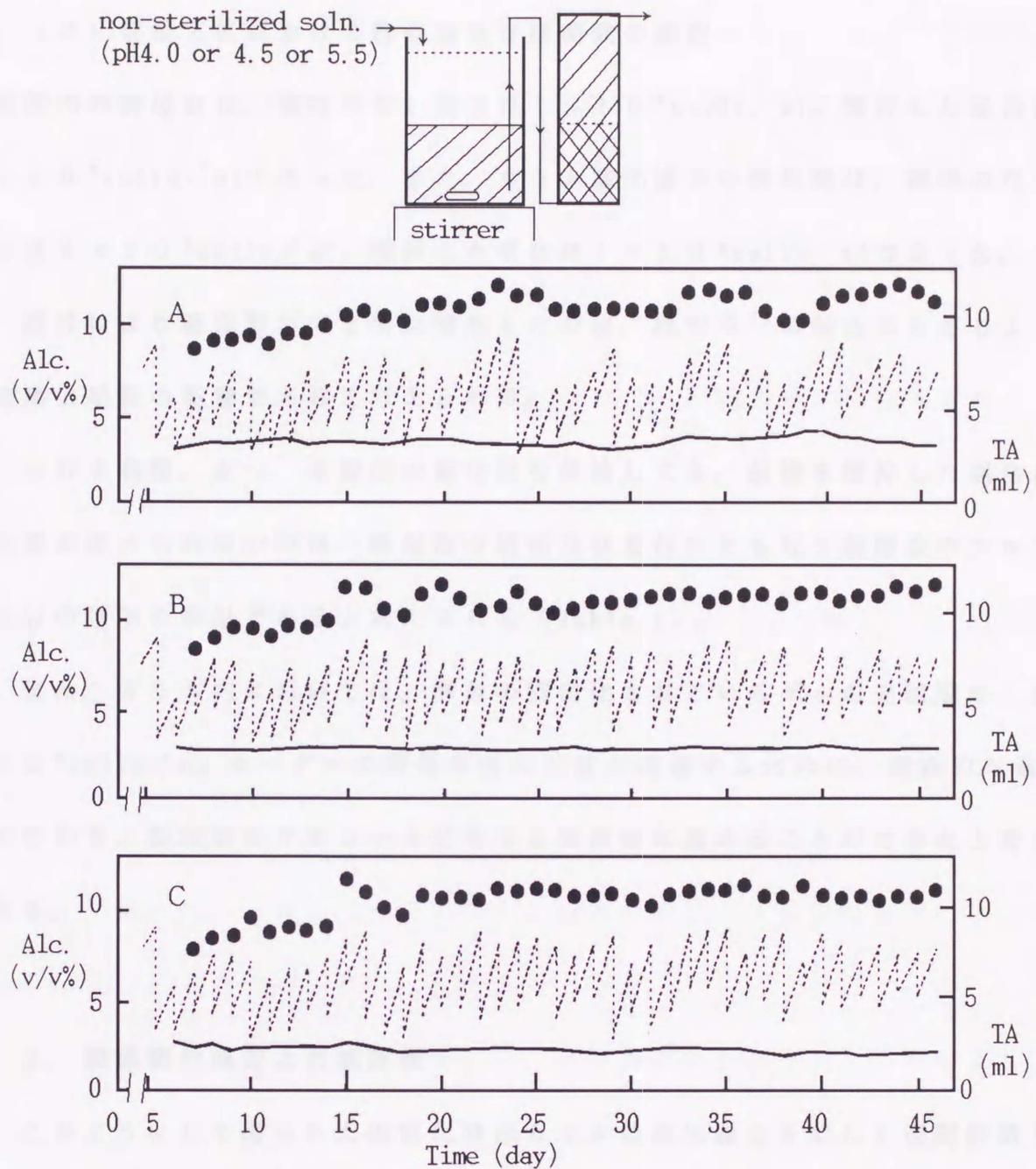


Fig. 4 Effect of pH of saccharified solution on the total acidity of effluent from the reactor, under stirring the pre-incubation tank.

In A, B, and C, non-sterilized saccharified solution having pH 4.0, 4.5, and pH 5.5, were used, respectively. Symbols are the same as in Fig. 2.

(4) 前槽方式における酵母数及び細菌数の測定

前槽内の酵母数は、攪拌のない場合は 1×10^8 cells/ml、攪拌した場合は 2×10^8 cells/mlであった。また、カラム溶出液中の酵母数は、攪拌のない場合は 5×10^7 cells/ml、攪拌した場合は 1×10^8 cells/mlであった。

攪拌により酵母数が、2倍に増加したのは、秋田ら⁷⁾の報告にもあるように酸素供給量の影響であると考えられる。

pH未調整、かつ、未殺菌の糖化液を供給しても、前槽を攪拌した場合には細菌が認められないのは、酵母数の増加及びそれにとまなう前槽液のアルコール分の増加の効果であると考えられる (Table 1)。

また、カラム内においては、酵母の固定化されているゲルの充填層を、更に 10^8 cells/ml オーダーの酵母を含んだ液が通過するために、最終的な流出液、すなわち、製成酒のアルコール分を12%前後に高めることができたと考えられる。

2. 製成酒の成分と官能評価

このようにして得られた固定化酵母カラムの流出液を5℃に1週間貯蔵した後、遠心分離により酵母を除去した製成酒について、一般成分と香気成分の分析及び酎酒による官能評価を行った。対照としては、同じ糖化液をバッチ式で発酵させたサンプルを用いた。その結果、成分的には若干異なるが、同じ連続発酵酒の中でもバラツキがあることから、糖化液のロットの違いも影響してい

ると考えられる。酸度に応じて直糖分を3～5%に調整して行った官能検査においては、pH未調整（pH 5.5）の連続発酵酒がやや良い評価となった。

（Table 2）

以上のように、連続式の固定化酵母カラムと反復回分式の前槽を組み合わせた前槽方式において、前槽を攪拌しアルコール分を平均6%に保つことにより、pH未調整の糖化液を用いても、雑菌汚染のない連続発酵が可能であることが確認できた。

従来の、並行複醗酵で醸造される清酒の成分は、アルコール濃度15～20%、酸度約1.5 mlであるのに対し、本章の糖化と醗酵を分離した単行複醗酵式の醸造法における、醗酵工程を固定化酵母を用いて連続化する方法により得られる製成酒の成分は、アルコール濃度約12%と低く、逆に酸度は約2.5 mlと高くなっていた。従って、得られた製成酒の香味は、従来の清酒とは異なったタイプであった。しかし、その酸味は、従来の清酒よりも爽快さが感じられ、寧ろ好ましいものであった。

この結果から、従来の酒類の香味に、ある程度の酸味をさらに付与することにより、その品質は好ましいものとなる可能性が考えられた。すなわち、本研究の、もう一つの目的である、新品質の製品開発の可能性の検討において、爽快な酸味の付与が、新しい品質の方向を示唆するものと考えられた。

Table 1. The cell density and the ratio by TTC stain of the yeast, in the pre-fermentation tank and the column effluent, under various conditions of the sacchrified solution and the pre-fermentation tank in continuous fermentation.

A. The cell density with non-stirred pre-fermentation tank.

day of running	pH4.5 non-steri.		pH4.5 steri.		pH5.5 steri.	
	pre.	column	pre.	column	pre.	column
30	1.2X10 ⁸ (-)	7.6X10 ⁷ (-)	1.0X10 ⁸ (-)	6.0X10 ⁷ (-)	1.4X10 ⁸ (+)	9.6X10 ⁷ (-)
36	-	4.8X10 ⁷ (+)	-	5.5X10 ⁷ (-)	-	6.3X10 ⁷ (++)
43	-	2.4X10 ⁷ (+++)	-	3.6X10 ⁷ (+)	-	5.6X10 ⁷ (++)

B. The cell density with stirred pre-fermentation tank.

day of running	pH4.0 steri.		pH4.5 steri.		pH5.5 steri.	
	pre.	column	pre.	column	pre.	column
30	2.6X10 ⁸ (-)	2.0X10 ⁸ (-)	1.7X10 ⁸ (-)	9.4X10 ⁷ (-)	2.2x10 ⁸ (-)	1.2X10 ⁸ (-)
36	-	1.3X10 ⁸ (-)	-	1.2X10 ⁸ (-)	-	7.5X10 ⁷ (-)
43	-	1.8X10 ⁸ (-)	-	7.4X10 ⁷ (-)	-	1.4X10 ⁸ (-)

C. TTC stain ratio (%) with stired pre-fermentation tank.

day of running	stain colour	pH4.0 steri.		pH4.5 steri.		pH5.5 steri.	
		pre.	column	pre.	column	pre.	column
36	red	100	100	100	100	99	99
	pink	0	0	0	0	0	0
	white	0	0	0	0	1	1
43	red	100	100	99	99	100	100
	pink	0	0	0	0	0	0
	white	0	0	1	1	0	0

The cell density of yeast were expressed as cells/ml. (-, +, ++, +++) shows cell amount of bacteria, not detect, trace, small, and large, respectively. The red colour yeast in TTC stain shows the KYOKAI yeast, the pink and white shows the wild yeast.

Table 2. Analytical data and sensory evaluation of the continuous fermentation of saccharified solution having pH4.0-5.5 with stirred or non-stirred pre-fermentation tank.

day of running	control(batch)		pH4.0 stirred		pH4.5 stirred		pH5.5 stirred		pH4.5 non-stir.	
			30	40	30	40	30	40	30	40
main components										
Alc(%)	11.9	12.0	11.7	13.9	13.0	13.6	12.8	13.7	12.0	12.6
TA(ml)	3.05	2.85	3.45	3.75	3.15	2.85	2.60	2.05	2.55	2.50
AA(ml)	0.90	0.85	0.80	1.50	1.25	0.95	1.10	0.65	1.35	1.40
DS(%)	2.6	2.1	0.4	0.5	0.5	0.6	0.6	0.7	0.7	0.8
flavor components(ppm)										
AcH	19	22	78	38	84	30	56	25	29	57
i-BuOH	-	-	69	59	76	52	69	95	55	74
i-AmOH	168	170	208	113	114	90	125	139	165	115
i-AmOAc	1.8	4.8	2.9	4.6	4.9	5.1	5.6	5.6	2.5	2.8
EtCap	1.1	1.2	0.5	0.9	0.7	0.9	0.7	0.9	0.5	0.6
quality score(5 point method)										
flavor	3.0	3.3	3.3	3.0	3.0	2.8	2.8	2.4	3.0	3.3
taste	3.0	3.3	3.3	3.5	3.0	3.2	2.3	2.5	3.3	3.0

Abbreviations: Alc, alcohol; TA, total acidity; AA, amino acidity; DS, direct reducing sugar; AcH, aceto aldehyde; i-BuOH, iso-buthyl alcohol; i-AmOH, iso-amyl alcohol; i-AmOAc, iso-amyl acetate; EtCap, ethyl caproate.

Flavour and taste were evaluated by a 5 point method. 1, excellent; 2, very good; 3, good; 4, not acceptable; 5, inferior. Scores were expressed by mean of 5 paneller's evaluations.

要 約

1. pH 4.0に調整した米粉糖化液を通常の方法で連続発酵する場合は、殺菌した原料糖化液を通液する必要があった。

2. 固定化酵母カラムの前に、固定化ゲルより溶出した遊離酵母を含む前槽を設置した場合、前槽液中のアルコール分を平均4%以上に保つことにより、pH 4.0の糖化液を未殺菌のままフィードしても、長期間にわたり汚染を防止できることがわかった。

3. さらに前槽を攪拌した場合には、アルコール分を平均6%以上に保持することができ、pH未調整(pH 5.5)、無殺菌の糖化液をフィードし連続発酵を行ったが、45日間にわたり雑菌汚染もなく、安定した酒質のものを得ることができた。

4. 得られた製成酒の酸度は約2.5 mlであり、従来の清酒よりも高かったが、その酸味は爽快なものであった事から、酒類に酸味を付与する事が、新しい品質の方向を示唆するものと考えられた。

文 献

- 1) 森川康：微生物， 2， 28 (1986)
- 2) 熊田順一， 須田幹夫； *Bio Industry*， 3， 13 (1986)
- 3) 山本哲郎、柳生淳二、太田香矢乃、浜野充博、大内弘造、西谷尚道：農化，
58， 559, (1984)
- 4) 西谷尚道、石川雄章， 飯村 稔；釀協， 79， (12) 886 (1984)
- 5) 村上英也監修；国税庁所定分析法注解， p6, 226, 305 日本釀造協会 (1981)
- 6) 吉沢 淑；釀協， 68， (1) 59 (1973)
- 7) 秋田 修， 大場俊輝， 中村欽一；釀協， 81， (8) 537 (1986)

清酒の連続醸造と新規酒類の製造

第 2 章では、酒類の連続醸造に不可欠な雑菌汚染防止の対策を、単行複醗酵式清酒醸造のモデルとして米粉（いわゆる白糠）糖化液のアルコール醗酵系を採用して、実験室規模の装置を用いて検討した。その結果、固定化酵母による米粉糖化液の連続醗酵において、細菌汚染に対して抵抗性のあるシステムを開発した。

この方法により得られる製成酒のアルコール濃度は約 12% であり、従来の清酒の 15～20% よりも低いものであった。また、酸度は約 2.5ml であり、従来の清酒の約 1.5ml よりも高いものであったが、この爽快な酸味が付与された酒類は、新規タイプ酒類の一つとして、新しい品質の方向を示唆するものと考えられた。そこで第 3 章では、新品質の製品開発の可能性を検討した。

以下、清酒および味醂の 2 種の酒類について、新規タイプ酒類の製造方法の確立を目指した。まず本章 A では、白米を原料として、バイオリアクターによる清酒の連続醸造における、装置のスケールアップと品質設計および最適運転条件の検討を行い、新規低アルコール清酒を製造することを目的とした。続く本章 B では、爽快な酸味を持った酒類製造のもう一つの応用として、生酸性の高い焼酎麹による、味醂の仕込を試みた。

A. バイオリアクターによる清酒醸造の最適化

第2章では、米粉糖化液を用いた実験室規模のモデル系において、育種したキラー酵母の固定化による米粉糖化液の連続醗酵を検討し、糖化液貯留用の前槽に、固定化酵母リアクターから遊離する多量の酵母をプールして予備醗酵させ、前槽液中のアルコール濃度を4%以上に保つことにより、pH未調整の無殺菌糖化液を醗酵原料として、本リアクターを、長期間、安全に運転することを可能にした。

すなわち、連続発酵中の細菌汚染防止には、高アルコール濃度と共にリアクター中の高遊離酵母濃度 (2×10^8 cells/ml) も必要であることが明らかになった。この結果は、従来の清酒醗の多槽式連続醸造において、腐造乳酸菌の増殖に対して抵抗性のある最適条件がpH 3.7~3.8、アルコール5~8%、温度14~15°C、酵母数 10^8 /g以上であるという結果¹⁾とほぼ一致するものであると考えられた。しかし、細菌による汚染と共に、野生酵母による汚染も考慮する必要があり、第2章のモデル系ではキラー酵母を使用していた。

本章Aでは、本システムの、本来の目的である白米糖化液を原料とした清酒の連続醸造における適合性と、装置のスケールアップ、及び最適運転条件について検討し、官能酒質的にも優れた品質を持つ、新規タイプ低アルコール清酒の製造法を確立することを目指した。

実験方法

固定化に用いる酵母としては、日本醸造協会製泡なし酵母 Kyokai 1001を使用した。

有機酸組成は、カルボン酸分析計（盛進製薬KK製）を用いて測定した。AATFase活性は、YOSHIOKA らの方法²⁾を用いて測定した。その他の分析方法は、第2章に準じて行った。

実験結果と考察

1. 原料白米の精米歩合の影響

Fig.1 に示した方法で、白米の液化及び糖化を行い、圧搾濾過を行って原料糖化液を得る。原料米の精米歩合の影響をTable 1 に示すが、精米歩合が低くなるにしたがって、糖化液の糖濃度は高くなり、酸度とアミノ酸度は低くなっている。この糖化液に培養酵母を添加して20℃においてアルコール12%になるまで醗酵させたところ、精米歩合が低いほど、醗日数は長くなり、製成酒の酸度、アミノ酸度および色度は小さい値となった。官能検査においては95%の場合はやや劣るものの、90%以下では差は認められなかった。従って、このような単行複醗酵式の仕込における、原料米の精米歩合としては90%が適しているものと考えられる。

Polished rice

soaked in water (250% parts of rice)
crashed by mixer with water
added calcium chloride (0.14%)
added liquefying enzymes
KOKUGEN (α -amylase :0.04%)
PROTEASE M AMANO (0.02%)
incubated at 50°C for 4 hrs
heated at 97°C for 0.5 hrs

Liquefied mash

added rice-koji (20% parts of rice)
added saccharified enzymes
GLUCOAMYLASE AMANO (0.06%)
incubated at 57°C for 14 hrs

Saccharified mash

filter pressed

Saccharified solution

added activated carbon

Purified saccharified solution

Fig. 1. preparation scheme of saccharified solution

Table 1. Effect of polishing rate of white rice on the components of the resulting saccharified solution and resulting *Sake* in batch fermentation.

polish rate	components of saccharified solution			
	total sugar (%)	reducing sugar (%)	total acid (ml)	amino acid (ml)
95 %	25.8	25.4	0.75	1.20
90 %	27.4	26.7	0.45	0.95
80 %	28.8	27.9	0.25	0.75
70 %	30.2	27.6	0.15	0.60

Polish rate	fermentation (days)	components of Sake				quality score (flavor - taste)
		alcohol (%)	total acid (ml)	amino acid (ml)	O.D. 430nm	
95 %	8	12.2	2.95	0.35	0.048	3.0 - 3.0
90 %	9	11.9	2.05	0.30	0.043	2.7 - 2.5
80 %	10	12.2	2.00	0.20	0.031	2.8 - 2.5
70 %	11	11.8	2.00	0.20	0.024	2.7 - 2.3

Flavour and taste were evaluated by a 5 point method. 1,excellent; 2,very good; 3,good ; 4,not acceptable; 5,inferior. Scores were expressed by mean values of 6 paneller's evaluation.

2. バイオリアクターによる清酒の連続醸造

次に、第2章の米粉糖化液を用いたモデル系システムの、90%精白米の糖化液を用いた清酒の連続醗酵系に対する適合性を、1段階スケールアップした装置を用いて検討した。さらに、第2章のモデル系では固定化に供する酵母として、野生酵母に対してキラー活性を示す育種酵母を使用した。種々の酵母を使用する実際の清酒醸造現場においてキラー酵母を使用することは、他の清酒酵母に対するキラー酵母による汚染の可能性が考えられ、現実的には困難であるので、キラー活性を持たない酵母を使用した連続醸造を検討した。

50ℓの攪拌器付き前槽（15℃一定）と25ℓの固定化酵母カラム（15～20℃の範囲で調節）からなるバイオリアクターシステムの装置概略図をFig. 2に示した。原料白米糖化液を、pH調整のための酸の添加や加熱殺菌は行わずに、1日に1回20ℓを前槽に補充しながら、50日間にわたり連続醗酵を行ったが、Fig. 3に示すように細菌による酸度の上昇は認められず、安定した運転が可能であった。また、キラー活性を持たない酵母を使用した。野生酵母はTTC染色による検出限界以下であったことから、本システムは細菌による汚染だけでなく、野生酵母による汚染に対しても、抵抗性を持っていることが示唆された。

以上の結果から、第2章のシステムは、白米糖化液を用いた実際の清酒醸造における醗酵過程連続化への導入が可能であること、及び装置のスケールアップも容易であることが明かとなった。

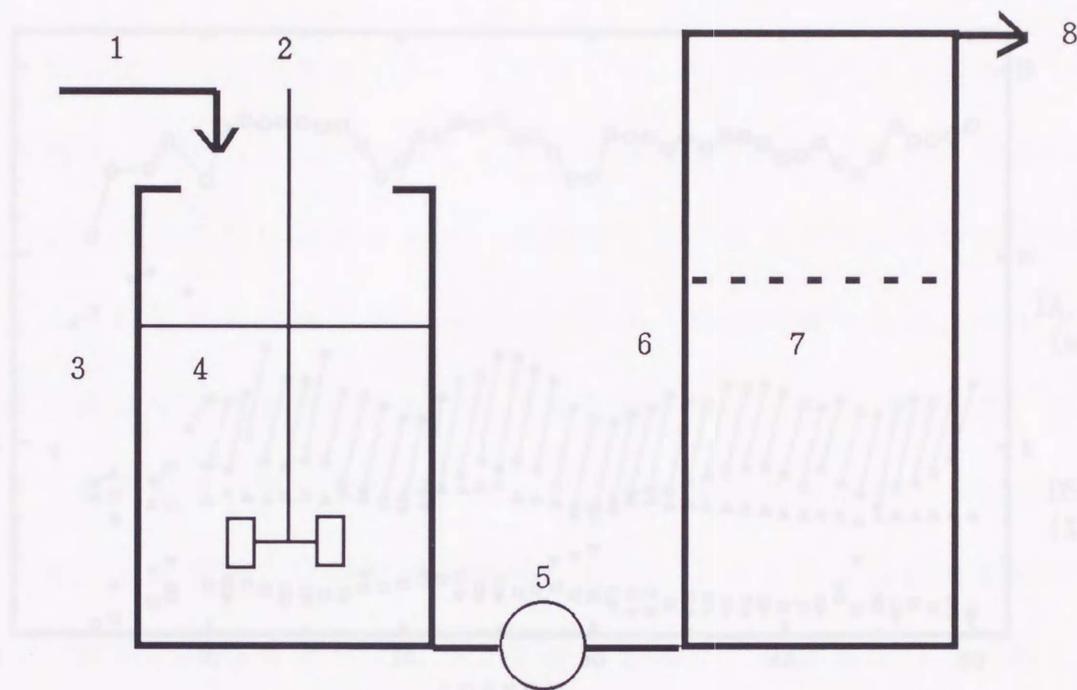


Fig . 2 . Schematic diagram of the immobilized yeast reactor system.
 1, Saccharified solution; 2, Stirrer; 3, Pre-incubation tank; 4, Pre-incubated solution containing free yeast; 5, Peristaltic pump; 6, Immobilized yeast column; 7, Immobilized yeast gel; 8, Continuous fermented sake;

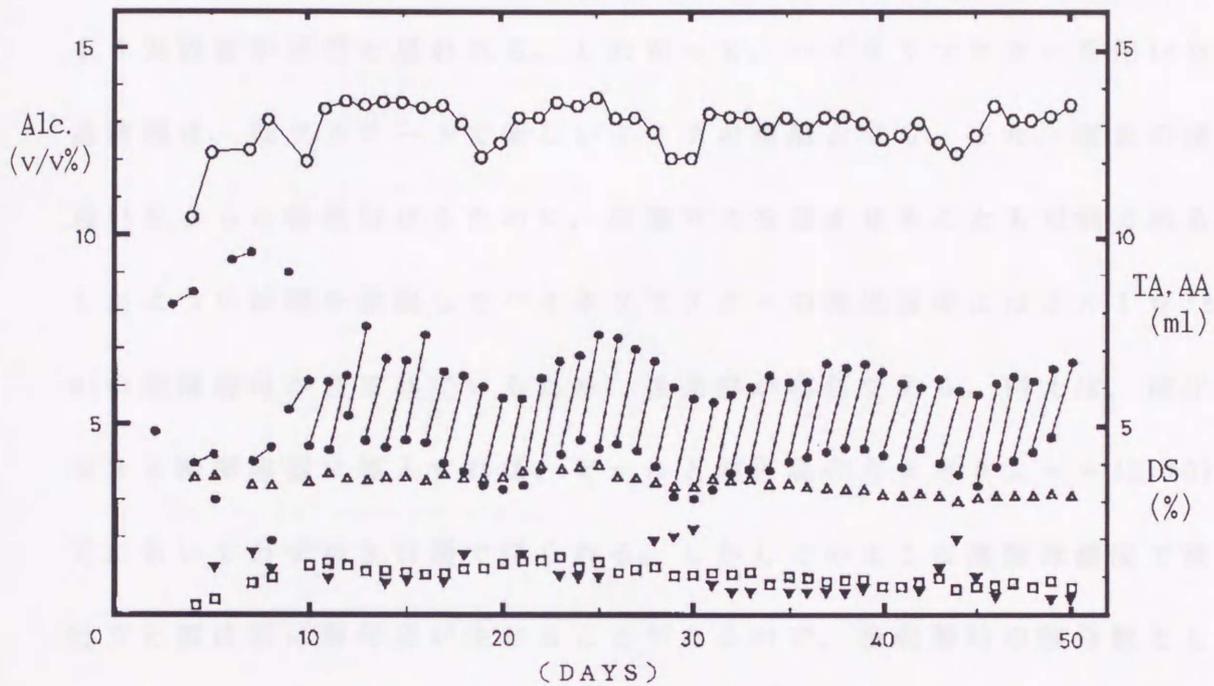


Fig. 3. Operation of the continuous fermentation of Sake using the bioreactor system with 50l pre-incubation tank and 25l immobilized yeast column.

Symbols: ○, alcohol concentration (v/v%) of the sake; ●, alcohol concentration (v/v%) of the pre-incubated solution; △, total acidity(ml) of the sake; □, amino acidity(ml) of the sake; ▼, direct reducing sugar concentration (%) of the sake.

3. 連続醸造清酒の特徴

糖化後発酵法によって得られる清酒の品質は、従来の並行複発酵式の清酒とは若干異なる。アルコール濃度は、20%まで可能という報告³⁾もあるが、原料の糖化効率やリアクターでの発酵速度および酒質の面を考慮すると、10～15%程度が妥当と思われる。したがって、バイオリアクターを用いた連続醸造清酒は、低アルコールで新しいタイプの清酒となる。また、従来の清酒との違いをさらに特徴付けるために、炭酸ガスを含ませることも可能である。上述したように前槽を接続したバイオリアクターの流出液中には 2×10^8 cells/mlの遊離酵母が含まれているため、後発酵が容易である。例えば、流出液をそのまま密閉容器に導入すれば、ビールと同程度のガスボリューム(2.70)が、5℃においてわずか3日間で得られる。しかしこのような高酵母濃度で後発酵を行うと製成酒に酵母臭が生じることがあるので、後発酵時の酵母数としては 5×10^7 cells/mlが最適と考えられた。

以上の検討結果をもとに、バイオリアクターで連続醸造した低アルコール清酒と、従来の市販清酒2種類との成分比較を、Table 2に示した。今回のバイオリアクターを用いた連続醸造清酒は、従来の清酒と比較して、アルコールは低い、炭酸ガスを含み有機酸含量と香り成分(特にエステル類)が多くなっていた。さらに、有機酸の組成割合に関しても、今回の清酒は従来のものに比べて乳酸の割合が少なく、ピルビン酸とリンゴ酸及びコハク酸の割合が多くなっており、壮快な酸味と高い香りを持った新規なタイプの清酒であった。

Table 2. Analytical data of the traditional *Sake* and the novel type *Sake* fermented by the bioreactor.

	traditional 1	traditional 2	bioreactor
sake meter	+0.5	-0.5	-32
alcohol(v/v%)	15.8	13.8	9.5
total acid(ml)	1.40	1.30	2.70
CO ₂ (%)	0.0	0.0	0.5
carboxylic acids(μ g/ml)			
pyro-glutamic	272	254	414
lactic	659	568	344
acetic	79	26	72
pyruvic	40	17	274
malic	113	121	366
citric	29	51	86
succinic	260	281	610
(total)	(1452)	(1318)	(2166)
flavor components(ppm)			
i-BuOH	11	16	43
Et-But	trace	trace	0.2
i-AmOH	59	81	101
i-AmOAc	trace	0.7	5.3
EtCap	0.2	0.3	0.7

Abbreviations: i-BuOH, iso-butyl alcohol; Et-But, ethyl butyrate; i-AmOH, iso-amyl alcohol; i-AmOAc, iso-amyl acetate; EtCap, etyl caproate.

4. バイオリアクターにおける遊離酵母の寄与

バイオリアクターによる発酵は一般的には固定化酵母のみで行われるが、本稿のリアクターシステムでは前槽において増殖した酵母がそのまま固定化酵母カラムに導かれるため、遊離酵母と固定化酵母の両方が発酵に関与することになる。そこで、バイオリアクターにおける遊離酵母の影響を調べた。

Fig. 4 に示したように 1000mlのフラスコと250mlのカラムをそれぞれ3セット用意し、AとCのフラスコには500mlの糖化液を入れ培養酵母を添加して前槽とし、Cのカラムには100mlの固定化酵母ゲルを充填した。Bのフラスコには加熱殺菌を行った糖化液500mlを無菌的に入れ、Bのカラムに100mlの固定化酵母ゲルを充填した。すなわち、システムAでは培養酵母のみで発酵が行われ、システムBでは固定化酵母のみで発酵が行われる。システムCでは前槽培養酵母と固定化酵母の両方が発酵に関与することになる。これらの3種類のシステムを用いて同時に18℃、20日間の連続醗酵を行った結果をTable 3 に示した。ここで示した生産性は、1時間当たりのアルコール生産量を、発酵が行われたリアクターの容量（A, Cは750ml、Bは250ml）あるいはシステム全体の容量（A, B, Cとも750ml）で割った値である。例えばシステムBにおける、リアクター当たりの生産性は 228 （流出液量） $\times 10.1$ （アルコール濃度） $\div 250$ （リアクター容量） $\div 24$ （時間） $= 0.38$ となる。Bのリアクター当たりの生産性がAより高いことは、固定化酵母の有効性を示している。しかし、システム全体の容量当たりの生産性はBが低くCが高いことは、遊離酵母の共存が

生産性の向上に寄与していることを示している。

バイオリアクター流出液を後発酵して得られた製成酒の、分析値と官能検査値をTable 4に示した。酸度に関してAがBとCよりも低い値となっていることは、遊離酵母は固定化酵母に比べて生酸性が低いことを示している。また、アミノ酸度に関してBがAとCよりも高いことは、固定化酵母は遊離酵母に比べてアミノ酸取り込み能が低いことを示している。香気成分に関して、i-AmOHはBがAとCよりも低くエステルはAがBとCよりも低いことは、遊離酵母は固定化酵母に比べてエステル生成能が低いことを示している。官能検査においてCはAとBよりも良い評価となったことから、固定化酵母リアクターにおける遊離酵母の存在は雑菌汚染の防止だけでなく、アルコール生産性と官能酒質の向上にも寄与することが明かとなった。

Table 3. Productivity of yeast-fermenting by various bioreactor systems.

Bioreactor system	Yeast used	Medium	Productivity	
			g/L reactor	g/L vessel
1	1	1	1.5	1.5
2	1	1	1.5	1.5
3	1	1	1.5	1.5
4	1	1	1.5	1.5
5	1	1	1.5	1.5
6	1	1	1.5	1.5
7	1	1	1.5	1.5
8	1	1	1.5	1.5
9	1	1	1.5	1.5

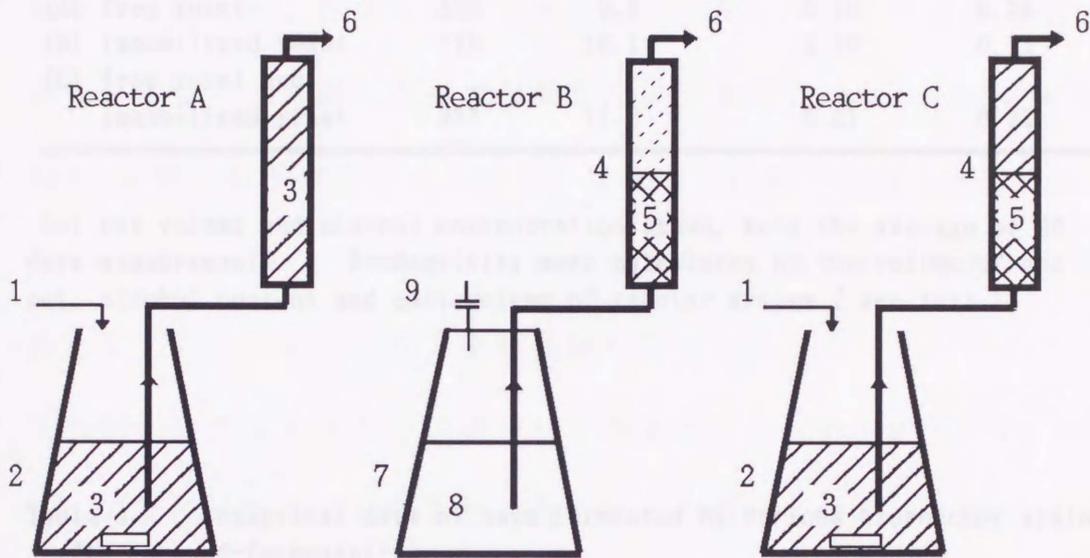


Fig . 4. Schematic diagram of three bioreactor systems
 1, saccharified solution; 2, pre-incubation tank; 3, pre-incubated solution containing free yeast; 4, immobilized yeast column; 5, immobilized yeast gel; 6, continuous fermented sake; 7, reservoir; 8, sterilized saccharified solution; 9, air filter

Table 3. Productivity of sake fermented by various bioreactor systems.

reactor system	out put (ml/day)	alcohol (v/v%)	productivity	
			per reactor	per system
(A) free yeast	288	9.9	0.16	0.16
(B) immobilized yeast	228	10.1	0.38	0.13
(C) free yeast and immobilized yeast	337	11.2	0.21	0.21

Out put volume and alcohol concentration shown, were the average of 20 days measurements. Productivity were calculated by the volume of out put, alcohol content and unit volume of reactor system (see text).

Table 4. Analytical data of sake fermented by various bioreactor system, after second-fermentation.

reactor system	Alc (v/v%)	TA	AA	flavor components			quality score	
				i-AmOH	i-AmOAc	EtOCap	flavor	taste
(A) free yeast	11.0	2.05	0.15	250	1.0	0.1	2.6	2.4
(B) immobilized yeast	11.0	2.65	1.10	152	1.9	0.6	2.8	2.7
(C) free yeast and immobilized yeast	12.1	2.60	0.35	260	1.4	0.6	2.2	2.0

Abbreviations: Alc, alcohol; TA, total acidity; AA, amino acidity; i-AmOH, iso-amyl alcohol; i-AmOAc, iso-amyl acetate; EtOCap, ethyl caproate. Flavor components value were expressed with ppm.

5. 前槽における溶存酸素の影響

本バイオリアクターシステムは原料の糖化液を前槽へ定期的に（1日に1回）供給するので、このとき前槽中の酵母濃度は約1/2に希釈される。前述したように遊離酵母は 2×10^8 cells/ml以上必要であるので、連続発酵中の前槽の希釈率に応じて、酵母を増殖させる必要がある。ここでは酵母の増殖と溶存酸素の影響を、表面積の異なる前槽を用いて検討した。Fig. 5 に示したように、500mlの糖化液と培養酵母を直径の異なる2種類の前槽（表面積はAが 63.2 cm^2 、Bが 23.8 cm^2 ）に添加した。それぞれに、同じ条件の固定化酵母カラムを接続し 18°C 、20日間の連続発酵を行った。

Table 5 に示すように前槽の溶存酸素はAが0.02ppmに対しBは0.01ppmとなり、遊離酵母数もAは約2倍となった。前槽の香気成分に関して、AはBに比べてアルコール類は高くエステル類は低い値となった。Table 6 には、リアクター流出液を後発酵して得られた製成酒の分析値を示した。アルコールと酸度の値はほぼ同じであったが、アミノ酸度に関してはAが低い値となった。Bはエステル類が高く、官能検査の結果もAよりもやや良い評価となった。AはBより、遊離酵母とアルコール類が多いにも関わらずエステル類が低い原因として、遊離酵母中のacetyl-CoA含量が少ない、あるいはalcohol acetyl-transferase (AATFase) 活性²⁾が低いことが考えられた。

実際に、連続発酵20日目の遊離酵母のAATFase活性を測定したところ、Bは4.6 unitsであったのに対しAは約1/15の0.3 units (AATFase活性の1 un

itは、 $1 \text{ ppm i-AmOAc} / 2 \times 10^8 \text{ cells/hr}$)であった。同様の測定を無細胞抽出液で十分量の acetyl-CoAを添加して行っても、Bは4.1 unitsであったのに対しAは0.4 unitsと低いままであった。この結果よりAのエステル類の少ない原因は、遊離酵母の acetyl-CoA含量でなく AATFase活性が低いためであることが明かとなった。

この酵素活性の差が前槽の溶存酸素濃度の違いによることを確かめるため、Aの前槽のヘッドスペースを炭酸ガスで置換しながら、さらに10日間の連続発酵を続けた。すなわち、Aの前槽表面積はBに比べて広いため溶け込む酸素量が多くなっていると考えられるので、そのヘッドスペースをガス置換して嫌気状態にした。10日後に酵素活性を再度測定したところ、置換前の約1.2倍(3.7 units)に増加していたことから、酵素活性が低かった原因は溶存酸素濃度の影響であったことが確認された。以上の結果から、バイオリクターを用いた連続発酵清酒のエステル生成量を増やすためには、前槽の溶存酸素濃度を0.01ppm程度の嫌気条件に保ち、遊離酵母のAATFase活性を高く維持する必要があると考えられた。

Table 3. Analytical data of two pre-fermentation tanks with different diameter.

Surface area (cm ²)	Volume (cm ³)	Yeast concentration (cells/ml)	Yeast viability		
			1-24h	1-48h	1-72h
101	4.95	2.5 × 10 ⁷	84	100	2.7
101	4.95	2.5 × 10 ⁷	47	73	2.3

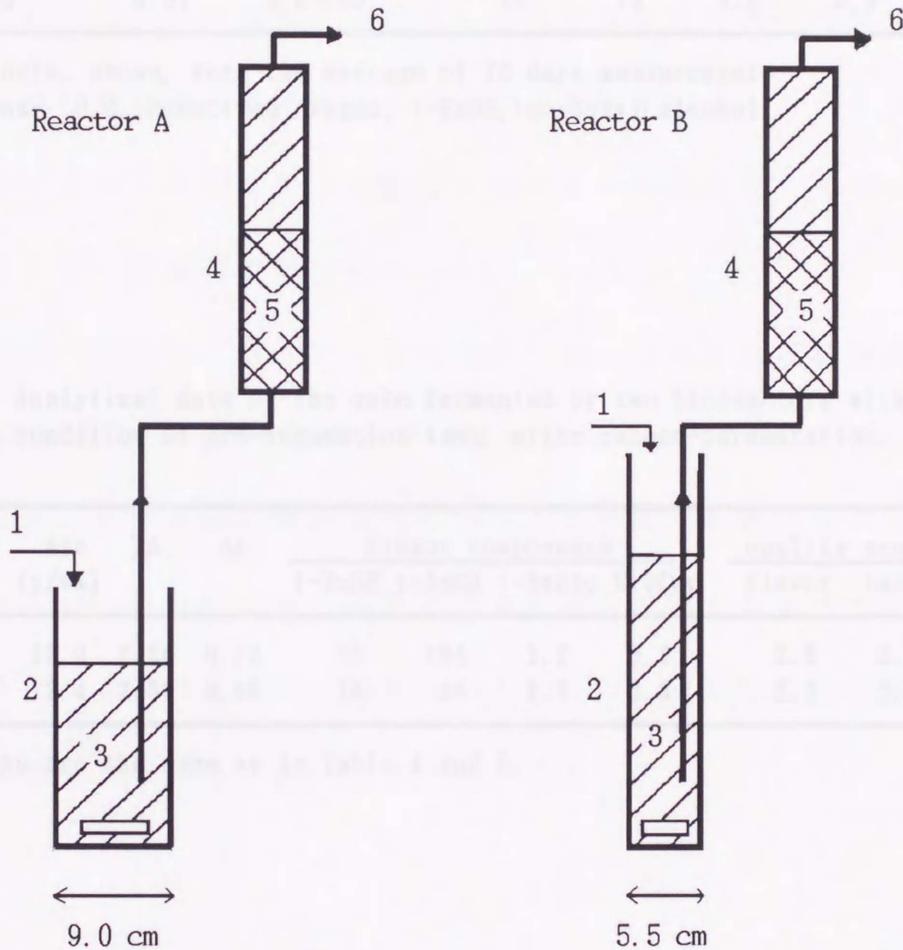


Fig. 5. Schematic diagram of two bioreactors with different pre-incubation tank
 1, saccharified solution; 2, pre-incubation tank; 3, pre-incubated solution containing free yeast; 4, immobilized yeast column; 5, immobilized yeast gel; 6, effluent solution (sake);

Table 5. Analytical data of two pre-incubation tanks with different diameter.

	surface area (cm ²)	D.O. (ppm)	cell density (cells/ml)	flavor components			
				i-BuOH	i-AmOH	i-AmOAc	EtOCap
(A)	63.6	0.02	3.9 × 10 ⁸	39	155	0.3	0.3
(B)	23.8	0.01	1.6 × 10 ⁸	15	75	3.6	0.9

Analytical data, shown, were the average of 20 days measurements.
Abbreviations: D.O., dissolved oxygen; i-BuOH, iso-butyl alcohol.

Table 6. Analytical data of the sake fermented by two bioreactors with different condition of pre-incubation tank, after second-fermentation.

reactor	Alc (v/v%)	TA	AA	flavor components				quality score	
				i-BuOH	i-AmOH	i-AmOAc	EtOCap	flavor	taste
system A	12.0	2.50	0.20	23	104	1.2	0.3	2.8	2.7
system B	12.4	2.35	0.65	14	80	4.2	0.9	2.5	2.6

Abbreviations are the same as in Table 4 and 5.

6. バイオリアクターのスケールアップ

本研究のバイオリアクターシステムにおいて、前槽の溶存酸素濃度が重要であることが明かとなったが、溶存酸素濃度は前槽の表面積だけでなく攪拌条件、その時点での液量および発酵状態によって影響を受ける。そこで、450ℓの前槽と200ℓの固定化酵母カラムからなるパイロットプラントスケールリアクターの構築に当たっては、溶存酸素センサーからの信号で攪拌機の回転数を変えることにより、溶存酸素濃度を制御するシステムを採用した。このリアクターにおいて温度を15～20℃に保った場合、アルコール濃度約10%の清酒が1日当たり約150ℓ生産可能であった。

1ヶ月間のパイロットプラント運転において、前槽の溶存酸素濃度は0.01 ppmに自動制御したが、その他の条件（遊離酵母数 2×10^8 cells/ml、前槽アルコール4%、リアクター流出液アルコール10%）を維持するため、定期的にサンプリングした分析値から温度と流速を適宜調節する必要があった。したがって、リアクターシステムの実プラント化には、より完全な自動制御システムが必要であると考えられた。

要 約

1. モデル系で検討した2章の連続醗酵システムは、白米糖化液を原料とした実際の清酒醸造にも適合性が認められた。本システムは、細菌と野生酵母の両方の汚染に対して、抵抗性を示した。

2. リアクター流出液中の遊離酵母を用いて後醗酵させることにより、炭酸ガスを含んだ新規な低アルコール清酒が安定して得られた。また、従来の清酒より有機酸含量が多く、爽快な酸味を帯びていた。

3. 固定化酵母リアクターにおける遊離酵母の存在が、雑菌汚染防止だけでなく、アルコール生産性と官能酒質の向上にも影響することが明らかになった。

4. 遊離酵母のエステル合成活性を高く維持するために、前槽の溶存酸素濃度を0.01ppm程度の嫌気条件に制御する必要があったが、さらに工業的規模にスケールアップを行うためには、アルコール濃度の自動制御が望まれた。

B. 焼酎麴を用いたみりんの製造

本章のAでは、バイオリアクターを用いた単行複醗酵式の清酒醸造法による製品は、爽快な酸味を持つアルコール濃度10～12%の新しいタイプの清酒であることを示した。本章のBでは、これに関連して、有機酸含量の多い酒類の応用として、生酸性の高い焼酎麴を味醂製造へ応用し、爽快な酸味と濃厚な風味を持つ新規みりんの製造を検討した。

実験方法

1. こうじの製造

精米歩合約90%の白米を浸漬蒸きょうし、これに河内菌白麴 (*Aspergillus kawachii*) を種こうじとして植えつけ、常法により製麴を行なった。

2. 仕込み方法

Table 7 に示すような仕込配合で仕込みを行なった。しょうちゅうこうじは α -アミラーゼ力が弱い⁴⁾ので、 α -アミラーゼの補添を行なった。 α -アミラーゼ剤としては天野製薬(株)製、ジアスターゼBD-N (α -アミラーゼ、 14×10^5 : グルコアミラーゼ、 15×10^3 : 酸性プロテアーゼ、 85×10^3 units/gを含む)を用いた。

30℃で仕込み、途中ときどき攪拌しながら45日間熟成させた。

また白ぬかの直接利用を考え、白ぬか仕込みも試みた。この場合は白ぬかを何ら蒸煮することなくそのまま仕込み、またアルコール歩合は20%のもので150%とした。

3. 分析方法

常法により一般分析を行なった。全糖はフェノール硫酸法⁵⁾、直糖はレーン氏の逆滴定法⁶⁾で測定した。オリゴ糖はペーパークロマトグラフィーにより定性的分析を、高速液体クロマトグラフィーにより定量的分析を行なった⁷⁾。ただし高速液体クロマトグラフィーでは試料調整を次のようにした。全糖濃度が70mg/ml以下になるよう水で希釈し、0.45 μ のミリポアフィルターでろ過、そのろ液1mlに溶媒(CH₃CN/DMSO/H₂O=90/5/5)2mlを加え十分に攪拌した。3,000rpm、10分の遠心分離を行なった上清をもって分析試料とした。

有機酸は盛進製薬製カルボン酸計により、アミノ酸は、日立アミノ酸アナライザー835型により測定した。

4. 煮切り試験

定性試験として加熱、加水、加アルコールによる白濁の有無⁸⁾をしらべた。

実験結果

1. こうじの製造

出こうじ歩合が20%で、酸度5.7、 α -アミラーゼ力価43.5unit/g-こうじのこうじができ上がった。

2. 製成みりんの一般成分

製成みりんの一般成分はTable 8 に示してある。いずれもアミノ酸度および酸度が高く、初期の目的にかなったものができ上がった。一般にアルコール分が低かったが、これは30℃という高温で45日も放置したため、揮発による欠減があったものと考えられる。

3. 製成みりんの有機酸

製成みりんの有機酸組成はTable 9にみるようにほぼ全量クエン酸で占められ、他に酢酸等が僅か認められた。

4. 製成みりんの糖組成

ペーパークロマトグラフィーでグルコース、イソマルトース、ニゲロース、コージビオース、パノース、イソマルトトリオースが検出された。それらの高速液クロによる定量値はTable 10のとおりで、グルコースが圧倒的に多く全糖

の70~80%を占め、イソマルトースがこれに次いでいた。

5. 製成みりんのアミノ酸組成

Table 11にみるように、こうじ歩合を変えただけのNo.1~No.3のみりんは、アミノ酸の総量にはそれぞれに応じた増減はあったが、組成比は全くといって良い程一致していた。白ぬかを用いたNo.4もアルギニンの組成比が他の3者よりやや低かったが、大体同じような組成を持っていた。総じてアルギニンとロイシンが圧倒的に多く、次いでグルタミン酸、フェニルアラニン、スレオニン等が多かった。また総含量も1%前後と市販の0.2%程度に比べればアミノ酸の極めて多いみりんができ上がった。

6. 煮切り

加熱、加水、加アルコールによる白濁生成はすべてのみりんについてみられなかった。

Table 7. Arrangement of materials for *Mirin* mash.

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
steamed rice(g)	1500	1500	1500	-
rice bran (g)	-	-	-	2.0
koji (g)	300	360	240	350
30% Alc (L)	2	2	2	-
20% Alc (L)	-	-	-	3
enzymes (g)	1.48	1.46	1.50	1.46

Table 8. Main components of the resulting *Mirin*.

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
Alcohol(%)	11.2	10.0	11.2	11.8
<i>Be'</i> (-)	17.2	17.2	16.8	17.8
total acidity(ml)	3.9	4.5	3.3	5.0
total-N(mg%)	350	370	330	-
Amino acidity(ml)	6.8	7.3	6.2	7.8
total sugar(mg/ml)	380	370	370	396
reducing sugar(mg/ml)	308	312	310	325
resulting volume(ml)	2,850	2,900	2,900	3,500

Table 9. Carboxylic acid composition of the resulting *Mirin*.

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
lactic	+	+	+	+
acetic (ppm)	26	16	20	12
pyruvic	-	-	-	-
formic	+	+	+	+
malic	-	-	-	-
propionic	+	+	+	+
succinic	-	-	-	-
citric (ppm)	1,826	2,112	1,496	1,718

Table 10. Sugar composition of the resulting *Mirin*.

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
	(mg/ml)			
glucose	271	261	289	318
maltose	3	0	3	6.5
iso-maltose	61	87	65	44
panose	2	14	1	0.3
iso-maltotriose	5	23	8	1.2

Table 11. Amino acid composition of the resulting and commercial *Mirin*.

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	commercial
	(%)				
aspartate	4.3	4.3	4.2	6.0	3.2
threonine	7.1	6.8	7.3	4.1	2.0
serine	4.9	4.9	4.9	6.2	4.5
gultamate	7.4	7.4	7.3	7.7	13.0
glycine	2.5	2.6	2.4	3.6	4.6
alanine	5.6	5.7	5.5	7.3	3.5
cystine	1.3	1.2	1.1	1.9	-
valine	6.5	6.5	6.5	7.6	3.1
methionine	3.1	3.1	3.2	1.0	0.4
isoleucine	4.6	4.3	4.8	4.0	12.0
leucine	11.4	11.5	11.4	12.1	13.0
tyrosine	6.1	6.1	6.4	5.6	6.0
phenylalanine	7.5	7.6	7.4	6.2	7.9
lysine	6.1	6.5	6.2	7.7	5.2
histidine	1.7	1.6	1.6	0.8	3.4
tryptophan	0.3	0.4	0.3	0.1	2.5
arginine	16.6	16.3	16.6	12.7	11.0
proline	3.0	3.1	2.8	5.4	4.6
total (mg/ml)	955.2	1021.6	905.6	1091.6	197.8

考 察

本章 B ではアミノ酸が多くしかも酸味のある新規なみりんを製造するため、しょうちゅう用麹菌 (*Aspergillus kawachii*) によるこうじを用いてみりんの仕込を行なった。その結果、初期の目的どうり酸度が 4 ~ 5、アミノ酸含量が 1 % という従来にない新しいタイプのみりんを製造することができた。

みりんのアミノ酸を多くしようとする試みは内田ら⁹⁾によってなされ、酵素剤の適当な組合せによって、全窒素 205mg%、フオルモール態窒素 81mg% のみりんが得られている。筆者らのものはそれより全窒素もアミノ酸もはるかに多いものとなった。また無圧蒸煮にも拘らず、煮切りは全然おこらなかつた。これはしょうちゅうこうじの酸性プロテアーゼが極めて強い⁴⁾ためであろうと考えられる。また白ぬか仕込みのものでアミノ酸生成が多かつたのは、熊谷らの生米仕込みの結果¹⁰⁾と同じように、生蛋白質の方が酵素作用を受け易いためと考えられる。

アミノ酸組成で特長のあるのは、アルギニンおよびロイシンが圧倒的に多い事である。うるち蒸米から酸性カルボキシペプチダーゼ作用によって放出されるアミノ酸組成¹¹⁾とも極めて良く似ている。このことは黄こうじ菌も黒こうじ菌も、酸性カルボキシペプチダーゼの基質特異性が似ていることを示唆している。このアミノ酸組成は市販みりんの分析例¹⁰⁾と多少異なり、市販みりんではグルタミン酸、イソロイシンもアルギニン、ロイシンと並んで主要成分を占め

ていた。もっとも絶対量は本章によるみりんよりはるかに少なかった。

しょうちゅうこうじはグルコアミラーゼが弱く、トランスグルコシダーゼが強いから、非醗酵性オリゴ糖の比率の大きいみりんが得られると期待されたが、グルコースが70～80%を占める結果となり、市販みりん¹²⁾よりやや少ない程度に終わった。ただしイソマルトースは全糖比約20%とかなり高い組成のものが得られた。

そもそも市販みりんの有機酸含量¹⁴⁾は、コハク酸として0.02～0.06%と極めて少ないのであるが、本章においては、0.2～0.3%（コハク酸として）と10倍も多いみりんが得られた。当然のことながら、クエン酸がその殆んど（0.15～0.20%）を占めていた。

みりんは従来主として調味料として使用され、飲料用にも本直しとして供されていたが、味が単調なためか今日では殆んど飲用されていない。その点本章で得たみりんは爽快な酸味があり、アミノ酸も多く含有しているので、リキュールの一種として、直接或いはカクテルベースとして飲用に供されることが大いに期待される。

以上、焼酎麴のみりん製造への応用により、爽快な酸味と濃厚な風味を持つみりんが得られることを示した。第3章Aの連続醸造清酒の結果と合わせて、爽快な酸味の付与が、新規酒類開拓の一つの方向であることが示唆された。

要 約

1. アミノ酸含量が多く爽快な酸味を帯びた新規なみりんを製造するため、しょうちゅう用こうじ (*Aspergillus kawachii*) による仕込みを行なった。この結果、酸度 3~5、アミノ酸度 6~8 という今迄にない新しいタイプのみりんが得られた。

2. アミノ酸含量は約 1% であったが、その組成においてアルギニンおよびロイシンが他より圧倒的に多かった。有機酸含量は約 0.2% 程度であったが、その殆んどはクエン酸で占められていた。糖組成においてはイソマルトース含量が約 20% と一般のみりんより多かった。

3. 爽快な酸味の付与が、新規酒類開拓の一つの方向であることを示唆した。

文 献

- 1)原 昌道、浜武 晃、大塚謙一、村上英也：醸協，64，(4) 379 (1969)
- 2)K. YOSHIOKA and N. HASHIMOTO： *Agric. Biol. Chem.*， 45， 2183 (1981)
- 3)末木雅昭、有川敬一、鈴木 顕：醸工，69，7 (1991)
- 4)布川弥太郎、岩野君夫、椎木 敏：醸協，76，(5) 354 (1981)
- 5)M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith： *Nature*， 168，
107 (1951)： *Anal. Chem.*， 28， 350 (1962)
- 6)高瀬澄夫：醸協，53，(9) 667 (1958)
- 7)布川弥太郎、岩野君夫、秋葉哲典：醸協，76，(10) 655 (1981)
- 8)山下 勝、山田鏡美：醸協，64，(12) 1045 (1969)
- 9)内田正裕、横村 哲、井上 浩：醸工，46，(10) 772 (1968)
- 10)熊谷知恵子、宮入正法、田中利雄、秋山裕一：日本醸工大会講演要旨集，
p. 155 (1981)
- 11)布川弥太郎、飯塚尚彦、岩野君夫、齊藤和夫：醸協，76，(4) 267 (1981)
- 12)今井富雄、入江淑郎、梅本春一、石家駿治：醸協，63，(1) 80 (1968)
- 13)井上 浩、鶴飼 勝、内田正裕、森田日出夫、齊藤幸一：醸協 57，(4) 332
(1962)
- 14)中村精一、竹内五男、島田 潔：醸協，60，(5) 447 (1965)

第 4 章

清酒の連続醗酵に関する動力学的検討

第 3 章では、白米を原料として、清酒の連続醗酵系のスケールアップと最適運転条件を検討し、①前槽中の遊離酵母を高濃度 (10^8 /ml) に保つこと、および、②前槽中の溶存酸素濃度を、酵母の増殖を許容する最小限度 (0.01 ppm) の嫌気条件に制限することにより良好な風味を持つ清酒製品を収率良く生産できることを示した。

なお、本連続醗酵系による製品は、爽快な酸味を持つアルコール濃度 10 ~ 12 % の新しいタイプの清酒である。これに関連して、焼酎用麴の味醂製造への応用により、爽快な酸味と濃厚な風味を持つ新しいタイプの味醂が得られることを示し、爽快な酸味の付与が、新規酒類開拓の一つの方向であることを示唆した。

すなわち、前章では、清酒の醸造に本連続醗酵系のバイオリアクターを導入することにより、工程の合理化と新品質の製品開発が可能となることを明らかにした。しかし、本連続醗酵系のパイロットプラントの運転においては、前槽とリアクター流出液の醗酵液を定期的にサンプリングし、アルコール及び酵母数の分析値から、温度と流速を手動操作により適宜調節する必要があり、連続醗酵工程の自動化という課題が残った。

そこで、第4章では、この清酒醸造工程の自動化のために、まず、本連続醗酵システムの動力的検討を行った。

本連続醗酵系では、繰り返し回分発酵を行う前槽と、これに連結した固定化酵母カラムからなり、前槽において遊離酵母の増殖をはかり、低濃度のアルコールを繰り返し生産し、カラムにて固定化酵母と前槽由来の遊離酵母が高濃度のアルコールを生産する。本システムは、以上のように構成されているため、単槽の連続発酵槽のように、希釈率を一定に保てば定常状態が得られるという単純なものではない。

したがって、本装置を安定に運転し、工程を自動化するためには前槽における繰り返し回分発酵、および、固定化酵母の連続反応という二つの過程に関する動力的問題を関連させて同時に解かねばならない。そこで、本章のAでは、固定化酵母と遊離酵母のアルコール生成速度式を構築するための検討を行った。

A. 固定化酵母と遊離酵母のアルコール生成速度式

本章 A では、遊離酵母のアルコール生成速度式を構築し、また、固定化ゲル中におけるグルコースとアルコールの拡散抵抗を考慮したモデルと、新たに提出する単純化したモデルを比較し、第 3 章の本システムの装置における操作条件と装置設計上の知見を得ることを目的とした。

実験材料と方法

供試菌株

Saccharomyces cerevisiae kyokai-701を用いた。

培地組成

速度式作成に関する実験には、Nagataniら¹⁾の用いた半合成培地を使用した。糖化液は第 2 章に従い調製した。

培養条件と固定化方法

遊離酵母の前培養は、30℃、24 h 静置培養し、速度式のパラメータ同定と連続発酵は特に断わらない限り 20℃にて行った。固定化方法はアルギン酸ナトリウムを用い、第 2 章に従って行った。ゲルの前培養は上記の半合成培地を用い、

30℃、3日間振盪培養によって行った。この時、12時間毎に培地を交換した。

連続発酵装置

装置の概略をFig.1に示した。前槽で繰り返し回分発酵を行いつつ固定化酵母カラムに連続的に通液し、原料糖化液は1日に一度投入した。本リアクターは糖化液の糖濃度にもよるが、通常最終アルコール濃度が10-13%(v/v)に、前槽は2-5%(v/v)の範囲で変動するように運転される。

分析

グルコースはグルコスタット法にて、エタノールはガスクロ法にて、菌体量は660nmの吸光度を測定し、あらかじめ測定しておいた乾燥菌体重量との検量線をもとに乾燥菌体重量として示した。ゲル中の菌体量は10%(w/v)トリポリリン酸にて溶解後希釈し、吸光度を測定して求めた。

データ解析

速度式中のパラメータの決定には初速度法¹⁾とタイムコースをEdwardsとWilk²⁾の式により近似、平滑後得られた式を微分して比速度を求め、培地成分中の状態変数との関係を解析した³⁾。

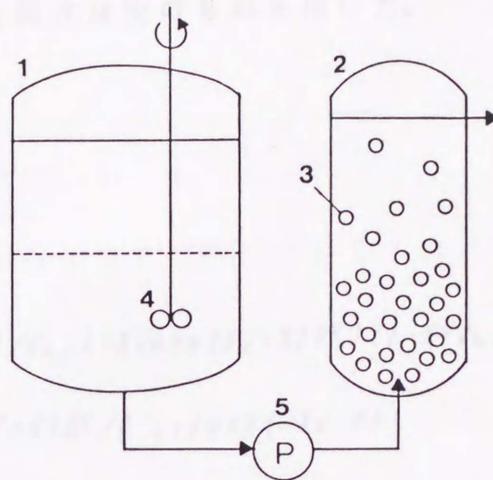


Fig. 1. Schematic diagram of the immobilized yeast reactor system with pre-fermentor. Saccharified rice solution was fed once a day to the pre-fermentor. Pre-fermented solution was supplied to the immobilized yeast-packed column at a constant feed rate.
 1, pre-fermentor; 2, column; 3, immobilized yeast; 4, agitator; 5, pump.

1. 遊離酵母のモデルとシミュレーション

回分発酵における状態方程式は次のものを用いた。

$$dX/dt = \mu X \quad (1)$$

$$dP/dt = \nu X \quad (2)$$

$$dS/dt = \rho X \quad (3)$$

$$\mu = \{ \mu_m S / (K_s + S + S^2 / K_{s_i}) - K_1 \exp(K_2 \cdot S) P^2 \} / (1 - X / X_m) \quad (4)$$

$$\nu = \alpha \mu + \nu_m S / (K_s' + S + S^2 / K_{s_i}') \exp(-K_3 \cdot P) \quad (5)$$

$$\rho = -\nu / Y_{P/S} \quad (6)$$

ここで、 X は菌体濃度、 P はアルコール濃度、 S はグルコース濃度、 μ は比増殖速度、 ν は比発酵速度、 ρ は比基質消費速度である。

遊離酵母の速度式中のパラメーターを決定をするに当たり以下の点に留意した。増殖に関する糖の高濃度阻害と制限律速⁴⁾ (K_s 、 K_{s_i})、アルコール濃度と糖による相乗的な阻害⁵⁾ (K_1 、 K_2) および菌体どうしの競争阻害⁶⁾ (X_m)。発酵に関して糖の高濃度阻害と制限律速³⁾ (K_s' 、 K_{s_i}')、アルコールによる阻害⁶⁾ (K_3) と増殖にともなう発酵⁷⁾ (α)。糖の消費に関しては発酵期間中アルコールの対糖収率 ($Y_{P/S}$) が一定であるとした。本速度式における特徴は(4)式においてアルコールとグルコースのレベルによっては比速度が負となり菌体の死滅も表していることである。

また、温度に対する影響はアレニウス式で表し、

$$\mu_m = A_1 \exp(-E_1/RT) \quad (7)$$

$$\nu_m = A_2 \exp(-E_2/RT) \quad (8)$$

とした。ここで、 E_1 、 E_2 は活性化エネルギー、 R は気体定数、 T は絶対温度、 A_1 、 A_2 は定数である。

パラメーターの決定方法は、 A_1 、 A_2 、 K_s 、 $K_{s,i}$ 、 K_s' 、 $K_{s,i}'$ 、 K_1 、 K_2 はアルコール及びグルコース濃度を種々変えた培地にてその初速度を測定¹⁾した。

また、 α 、 K_m 、 $Y_{p/s}$ は近似式を用いる方法³⁾により決定した。 K_3 、 E_1 、 E_2 は佐藤ら^{8, 16)}の値を用いた。Table 1に各係数をまとめた。

回分発酵における半合成培地の初発糖濃度及び培養温度の設定を変えてシミュレーションした結果をFig. 2 とFig. 3 に示した。(1) - (8)式をRunge-Kutta-Gill法を用いてシミュレーションを行った結果、Fig. 2 の条件では実測値とほとんど一致し、Fig. 3 の条件では低温度で若干の誤差を生じたもののほぼ実測値の傾向を表現でき、得られた速度式が遊離酵母の挙動を正確に示していることが分かった。

Table 1. Constants for calculations.

Constant	Value	Reference
A_1	3.27×10^{14} (/h)	this work
A_2	9.47×10^9 (g-ethanol/(g-cell·h))	this work
D_0	0.0316 (cm ² /h)	11)
E_1	85800 (J/mol)	8)
E_2	56500 (J/mol)	8)
K_1	1.64×10^{-5} (l ² /g ²)	this work
K_2	4.29×10^{-3} (l/g)	this work
K_3	0.017 (l/g)	16)
K_4	0.328 (-)	this work
K_5	1.54 (l/g-cell)	11)
α	1.97 (g-ethanol/g-cell)	this work
K_s	0.102 (g/l)	this work
K'_s	20.1 (g/l)	this work
$K_{s i}$	840 (g/l)	this work
$K'_{s i}$	375 (g/l)	this work
T_i	0.010 (cm)	this work
X_m	7.28 (g/l)	this work
$Y_{p/s}$	0.436 (g-ethanol/g-glucose)	this work

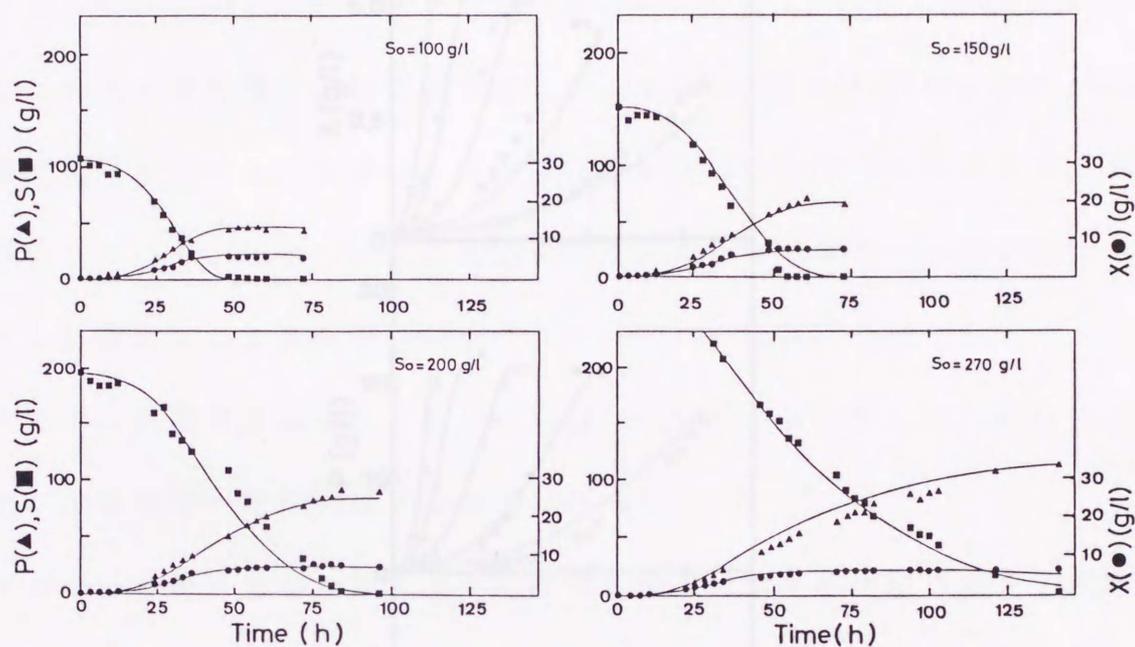


Fig. 2. Simulation results of batch culture at various glucose concentrations. S_0 indicates initial glucose conc.. Fermentation was done at 20°C. Lines: simulated results.

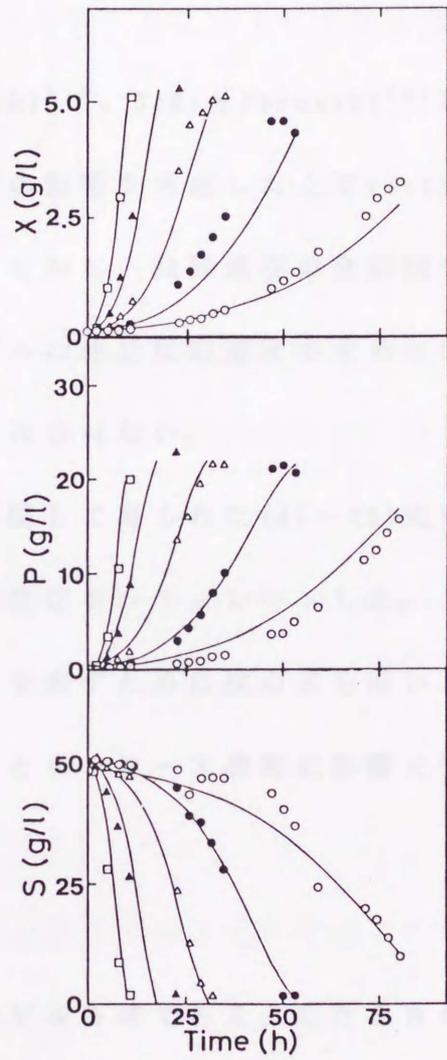


Fig. 3. Simulation results of batch culture at various temperatures. Initial glucose conc. was 50 g/l. Lines: simulated results. Symbols: ○, 10°C; ●, 15°C; △, 20°C; ▲, 25°C; □, 30°C.

2. 拡散方程式とそのシミュレーション

SatoとToda⁹⁾、TodaとSato¹⁰⁾は *Candida lipolytica* を用いて基質濃度、酸素濃度に対する速度式を作成し、寒天ゲル中の菌体の挙動をシミュレートしうることを報告している。

また、FurusakiとSeki¹¹⁾、SekiとFurusaki¹²⁾は *S. cerevisiae* を用いて拡散係数に及ぼす菌体濃度の影響を考慮した上で resting cell 及び growing cell の初速度を求めている。しかし、発酵過程の全期間を通して培地中の成分が動的に変化していく中でゲルの総括反応速度を求めながら培地中の成分をシミュレートした報告はあまりみられない。

そこで、遊離酵母に関して得られた(4)–(6)式をもとにして、拡散モデルを解き、回分発酵の状態変化をシミュレートした。

ゲル中の酵母の増殖を表すために次の式を用いた。局所的に存在する酵母は、その地点のアルコールとグルコース濃度に影響を受けつつ増殖していくものとし、

$$dX_r/dt = \mu_r X_r \quad (9)$$

ここで、添え字 r はゲルを球であるとしたときの中心からの距離であり、その地点における状態変数あるいは比速度を示す。ゲル中の最大菌体濃度 X_m は実験的に 300g/l-ゲルとした。

また、アルコールとグルコースの収支に関してTodaとSatoの式¹⁰⁾にしたがい次のような式とした。

$$\frac{\partial P_r}{\partial t} = D_e (\frac{\partial^2 P_r}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{\partial P_r}{\partial r}) + \nu X_r \quad (10)$$

$$\frac{\partial S_r}{\partial t} = D_e (\frac{\partial^2 S_r}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{\partial S_r}{\partial r}) + \rho X_r \quad (11)$$

ここで、拡散係数 D_e はゲル中の局所的菌体濃度に影響を受け、SekiとFurusakiの式¹²⁾に従いアルコールとグルコースの拡散抵抗は等しいとし、次の式で求めた。

$$D_{e_s}/D_{o_s} = D_{e_p}/D_{o_p} = D_e/D_o = K_4 (1 - K_5 X_r)^2 \quad (12)$$

ここで、 K_4 、 K_5 は定数であり、 D_o は水中での拡散係数を示し、添え字 P はアルコールの、 S はグルコースにおける値である。また、ゲル表面での境膜抵抗¹³⁾はゲル容量に対して培地容量が圧倒的に多く、緩やかな攪拌を行ったので今回の計算では考慮しなかった。

そのため境界条件はSekiとFurusaki¹²⁾に従い次のように設定した。ゲル半径を R_g とすると、

$$P_r = P, S_r = S \quad \text{at } r = R_g \quad (13)$$

$$\frac{\partial P_r}{\partial r} = 0, \frac{\partial S_r}{\partial r} = 0 \quad \text{at } r = 0 \quad (14)$$

回分発酵開始時のゲル中の菌体濃度の勾配を求めるために、(9) - (14)式をCrank-Nicolson法により解き、溶解して測定したゲル(半径1mm)の平均菌体濃度に達するまで計算した。ゲル中の菌体濃度の勾配は Fig. 4 のようになり、Toda, Sato¹⁰⁾の計算結果、Wadaら¹⁴⁾の電子顕微鏡写真の結果と同様基質濃度の枯渇により中心部の菌体濃度が希薄になっていた。

この時、ゲル中の平均菌体濃度 X_g は次の式を用いた。

$$X_g = \left\{ \int_0^{R_g} 4\pi r^2 X_r dr \right\} / \left\{ (4/3)\pi R_g^3 \right\} \quad (15)$$

また、ゲル一個当りの総括反応速度は次の式により計算した。

$$r_p = -D_e (4\pi r^2) \partial P_r / \partial r \Big|_{r=R_g} \quad (16)$$

$$r_s = -D_e (4\pi r^2) \partial S_r / \partial r \Big|_{r=R_g} \quad (17)$$

以上のようにゲル内菌体濃度勾配が得られたのでこれらを初期値として与え、発酵期間中変化しないものとした。

回分発酵のシミュレーションに使用したRunge-Kutta-Gill法は1刻み時間当り4回微分係数を算出するが、そのたびに境界条件(13)式において培地中の状態を更新し、総括反応速度を求めた。総括反応速度の算出にCrank-Nicolson法を用いた場合、差分法であるためゲル表面で微分係数を求める際に誤差が生じやすく、本来ならば有限要素法等を用いるべきであるが、非常に計算時間を必要とするため、定常状態が段階的に変化するとみなし、(10)、(11)式の左辺を零とおいた。したがって、(10)、(11)式はスツルム・リュウビル型の常微分方程式として取り扱うことができる。すなわち、ある時点の培地中の成分を境界条件(13)として、この境界条件のもとでゲル中心の状態を推定し解を得た。

また、培地中の速度式は次のように設定した。

$$dX/dt = \mu S_g t_i X_s / V + \mu X \quad (18)$$

$$dP/dt = r_p S_g / V + \nu X \quad (19)$$

$$dS/dt = r_s S_g / V + \rho X \quad (20)$$

ここで、 t_i はゲル表面における菌体放出に関与する有効厚さとして、ゲル表面の菌体の増殖分が放出されるという仮定のもとに、菌体の径の近似的な値として $10 \mu\text{m}$ とおいた。 X_s はゲル表面における菌体濃度、 V は培地容量、 S_g はゲルの総表面積を表す。

(18) - (20)式右辺第一項は固定化酵母による反応速度を、第二項は遊離酵母によるそれを表している。(18)式第一項は反応容器内の全ゲル表面 $10 \mu\text{m}$ からの菌体放出の速度を表している。以上の手順を培地容量 300ml 、ゲル容量 7ml 、ゲル内酵母濃度 120g/l の培養に適用して得られた結果をFig. 5中の一点鎖線にて示した。なお、培養開始10時間はラグタイムとみなした。その結果、今回使用したモデルにて固定化酵母の示す挙動を良好にシミュレートすることができた。

しかし、FurusakiとSeki¹¹⁾は(12)式中の係数 K_d を $0.728 (-)$ と報告しているが、今回は $0.328 (-)$ とした。これはFurusakiとSeki¹¹⁾の値の45%であり、Furusakiら¹¹⁾が拡散係数を測定した温度は 30°C であり、今回の実験条件は 20°C であったため、拡散係数が小さくなっていたと考えられた。

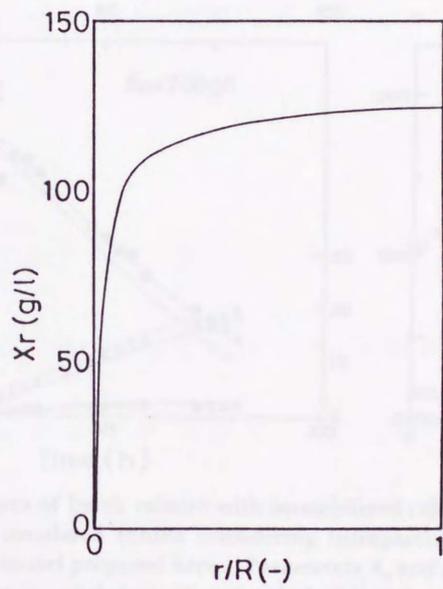


Fig. 4. Calculated cell density profile in a gel.

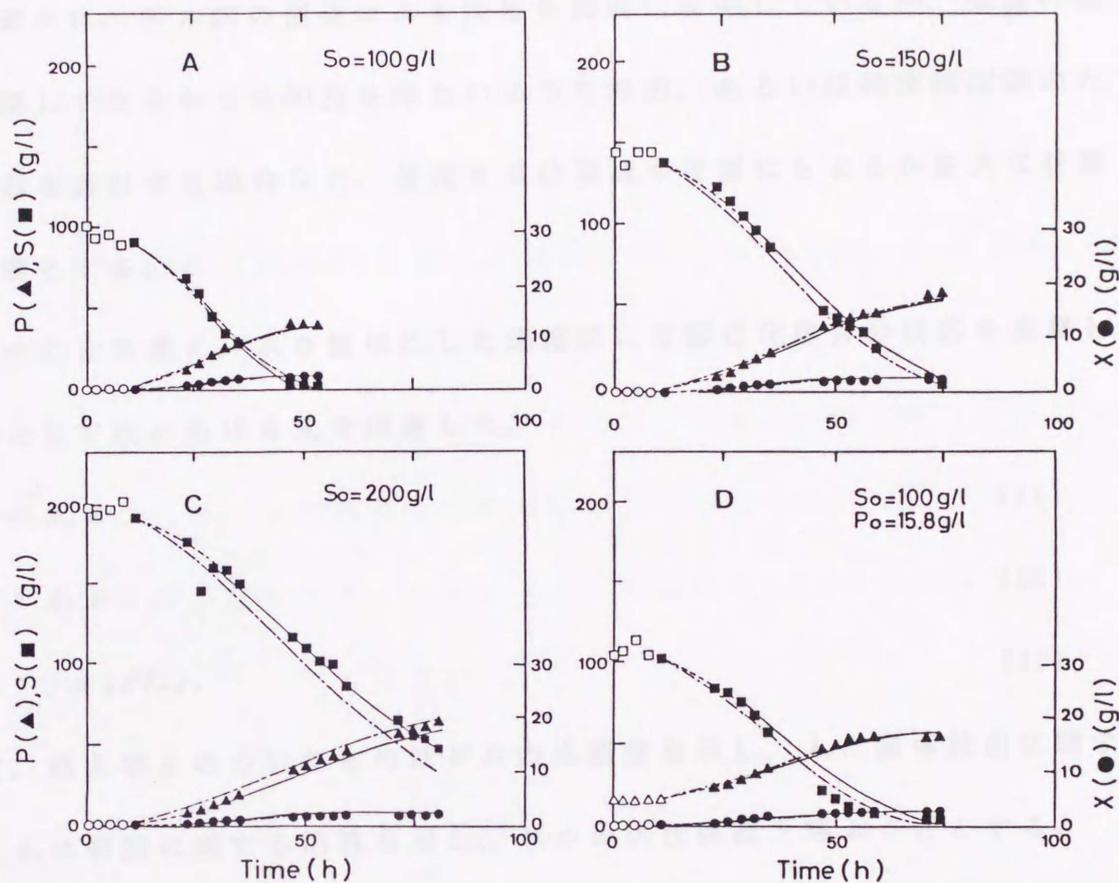


Fig. 5. Simulations of batch culture with immobilized cells at various glucose concentrations. Lines: ---, simulated results considering intraparticle mass-transfer resistance; —, simulated results by the model proposed here. Parameters A_x and A_p in eqs. (21) and (22) were identified, referring to the experimental data along the dashed line.

3. 活性係数を導入した固定化菌体の速度式

拡散方程式は以上のように非常に複雑なものであり使用するパラメータの数も多い。確かに、ゲル内の菌体による反応を高度に説明しているが、装置の運転条件に関してあらかじめ知見を得たいような場合、あるいは発酵槽制御のための制御器を設計する場合など、使用する計算機や言語にもよるが膨大な計算時間を必要とする。

これらのことを考え、より簡単化した速度式にて固定化菌体の反応を表現し得るものとして次にあげる式を用意した。

$$\mu_g = A_x \mu \quad (21)$$

$$\nu_g = A_p \nu \quad (22)$$

$$\rho_g = -\nu_g / Y_{p/s} \quad (23)$$

ここで、添え字 g のついたものはゲルの比速度を示し、 A_x は菌体放出に関する活性、 A_p は発酵に関する活性を示し、ゲルの活性係数と呼ぶこととする。

すなわち、遊離酵母の比速度に $0-1$ の活性係数を乗じ、固定化されることによりどの程度酵母のトータルの活性が低下しているかを示している。これらのパラメータはあらかじめ実験により決定するか、リアルタイムに測定データに適応させて同定すればよい。

これらの式を回分発酵で使用するために、状態方程式は次のようにした。

$$dX/dt = \mu_g V_g X_g / V + \mu X \quad (24)$$

$$dP/dt = \nu_g V_g X_g / V + \nu X \quad (25)$$

$$dS/dt = \rho_g V_g X_g / V + \rho X \quad (26)$$

ここで、 V_g はゲル容量、 X_g は平均ゲル内酵母濃度を示す。

(21) - (26)式を解き、拡散方程式の結果と比較した結果をFig. 5に示した。点線部分は A_x, A_p 同定のために使用し、以後の経過を予測した結果を実線で示した。パラメータ同定にはNewton-Raphson法を使用した。

活性係数の同定結果はFig. 5Aに示した条件の時、 $A_x=0.042$ 、 $A_p=0.208$ 、Bの時、 $A_x=0.021$ 、 $A_p=0.176$ 、Cの時、 $A_x=0.015$ 、 $A_p=0.145$ 、Dの時、 $A_x=0.030$ 、 $A_p=0.157$ であった。傾向として A_x 、 A_p 共にグルコース濃度が高くなり、酵母にとって条件が厳しくなるにつれ活性係数が小さくなるようであった。また、アルコール発酵能は固定化されることによって、遊離酵母の15-20%に低下することがわかった。

拡散方程式の結果と活性係数を用いた結果及び実測値はかなり一致しており、固定化菌体の挙動を本方法により簡単に示すことが可能であった。

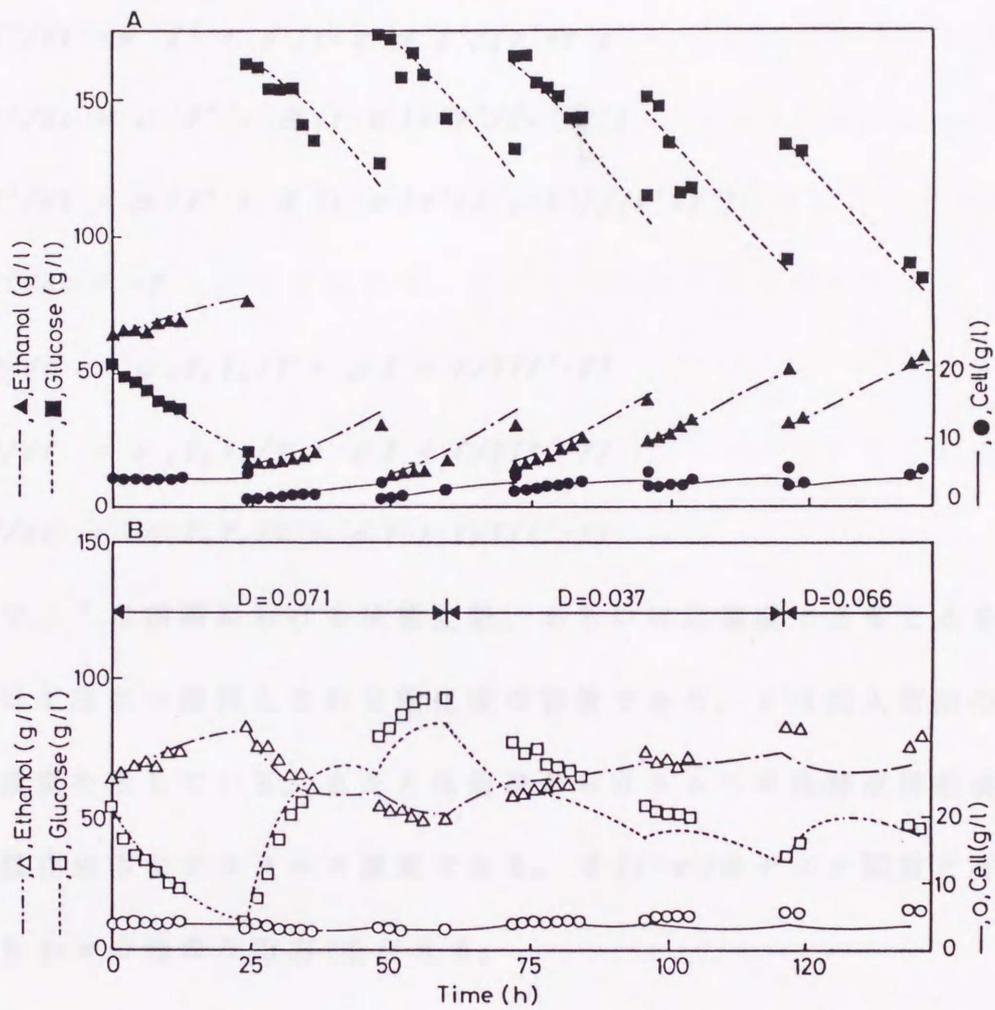


Fig. 6. Simulation of the immobilized yeast-packed column with pre-fermentor. Lines: simulated results. A: pre-fermentor, B: column. Parameters identified; $A_x=0.050$, $A_p=0.260$.

4. 前槽付き連続発酵槽のシミュレーション

以上までの結果を総合すると次のような前槽付き連続発酵槽に関する状態方程式が得られる。

$$dX'/dt = \mu'X' + \delta(t-\tau)v'X'/(v'+V') \quad (27)$$

$$dP'/dt = \nu'X' + \delta(t-\tau)v'P'/(v'+V') \quad (28)$$

$$dS'/dt = \rho'X' + \delta(t-\tau)v'(S_{i_n}-S')/(v'+V') \quad (29)$$

$$dv'/dt = -F \quad (30)$$

$$dX/dt = \mu_0X_0V_0/V + \mu X + F/V(X'-X) \quad (31)$$

$$dP/dt = \nu_0X_0V_0/V + \nu X + F/V(P'-P) \quad (32)$$

$$dS/dt = \rho_0X_0V_0/V + \rho X + F/V(S'-S) \quad (33)$$

ここで、' は前槽における状態変数、あるいは比速度であることを示しており、 V' は 1 日に一度投入される糖化液の容量であり、 v' は投入直前の前槽中の発酵液液量を示している。また F は前槽からカラムへの発酵液供給速度であり、 S_{i_n} は糖化液中のグルコース濃度である。 $\delta(t-\tau)$ はデルタ関数と呼ばれるものであり $t=\tau$ の時のみ出力 1 を与える。

長棟ら¹⁶⁾ はインパルス的な基質供給を表すために用いている。前槽中の状態の進展に伴って (31) - (33) 式は影響を受け複雑な挙動を示し、カラム内のアルコール生成に前槽由来の遊離酵母が寄与することを示唆している。

Fig. 6 は前槽付き連続発酵における糖化液を用いた運転結果を示したものであり、前槽最大容量 600ml、カラム容量 305ml、ゲル容量 59ml の装置における

結果である。Fig. 6 から明らかなように、糖化液の投入によりカラム内の成分が影響を受け、前槽中の発酵が進むとともに微妙な曲線を描いていた。Fig. 6 では故意に培地供給速度（希釈率）を上下させてあり、1日目のデータをもとにパラメータ同定を行い、以後を予測したものであるが実測値とシミュレーション結果は良好に一致した。この時の活性係数の同定結果は $A_x = 0.050$ 、 $A_p = 0.260$ であり、Fig. 5 の結果と比べわずかに大きくなっていた。その原因は明かでないが、Fig. 5 では半合成培地、Fig. 6 では糖化液を用いたことがその一因であると思われた。

5. 前槽付き連続発酵装置の装置設計と運転条件

以上のように本装置のプロセスを記述するモデルが確立されたので、装置設計上、運転上必要な以下の情報をシミュレーションにより算出した。

- 1、前槽とカラムの容量バランスはどの程度にすべきか。
- 2、目標の生産量を達成するためには、どの程度のカラム容量が必要であり、どの様に運転すべきなのか。

本装置における流速は1日に一度に前槽に投入する原料糖化液の量で決まる。さらに、原料糖化液の投入量は投入後のアルコール濃度をどの程度に設定するかによって左右される。この点に着目し、まず、前槽について解析した。

前槽は繰り返し回分発酵形式であるので、1日に投入する糖化液液量を一定にした場合、投入直前（あるいは直後）のアルコール濃度は計算上次第に一定

値に収束する。この事を利用して、20℃における投入直後のアルコール濃度の収束値とその時の糖化液投入による希釈倍率及び投入直前のアルコール濃度の関係を(4)-(6)、(27)-(30)式をもとに計算したものがFig.7である。この時、投入する糖化液中のグルコース濃度は、第2章で述べた汲水歩合を250%とした時に得られるグルコース濃度に近い200g/lとした。Fig.7より、投入後の濃度が低いほど希釈倍率が大きく、また達するアルコール濃度も低いため、未殺菌糖化液を投入した場合の雑菌汚染の可能性が増える。しかし、一方では投入後の濃度を高く設定すると、希釈倍率が小さく時間当りの生産物の量が減る。

前槽におけるアルコール濃度と糖化液投入による希釈倍率の関係が明かとなったので、次に装置全体について解析した。

Fig.8は、前槽において糖化液投入後のアルコール濃度の設定値をパラメーターとして、前槽容量に対する固定化酵母カラム容量の比(V_c/V_z)を変えて流出液中のアルコール濃度(Fig.8 A)、リアクター(前槽+カラム)単位容量当りの生産性(B)、またカラム単位容量当りの生産性(C)を(27)-(33)式をもとに計算した結果である。この時カラム温度20℃、ゲル充填率40%、ゲル内酵母濃度120g/lとし、 A_x 及び A_p の値はFig.6で求めたものを用い、前槽への1日の投入分が1日の流出量とした。なお、 V_z は(27)-(29)式中 V' と v' の和である。また、流出液中のアルコール濃度は1日の間に前槽の影響を受けて変動するが(Fig.6)、1日の平均を算出した。

アルコール濃度80g/lを目標成分として清酒を得ようとした場合、前槽中糖

化液投入後の設定濃度の各々に対して、Fig. 8 Aにて得られる V_c/V_z を求め、その座標をFig. 8 B中△としてプロットした。各々の△の V_c/V_z について得られるリアクター単位容積当りの生産性はFig. 8 B中▲としてプロットした。その結果、生産性は前槽糖化液投入後の濃度を低く設定したときほど高いことがわかる。

しかし、前槽は雑菌汚染を考慮した時、投入後の設定濃度が3%(v/v)以上になることが望ましく(第2章)、この制約のもとで目標アルコール濃度を得ようとした場合、 $V_c/V_z = 0.38$ (Fig. 8 A中●)とし、前槽中投入後の濃度を3%(v/v)に設定して運転すべきであることが結論として得られる。また、この時のカラム単位容量当りの生産性(Fig. 8 C中○)から、充填率40%のカラム1ℓ(前槽容量 $1/0.38=2.6$ ℓ)当り日量1.63ℓの清酒を生産できることがわかる。

この結果をもとにして、第3章で述べたパイロットプラントの V_c/V_z は0.39として設計、製作した。このように本モデルを用いることにより、設定したアルコール濃度の清酒を得るために必要な装置容量、また、糖化液の処理量をあらかじめ知ることができ、操作上の指針を得ることが可能であった。

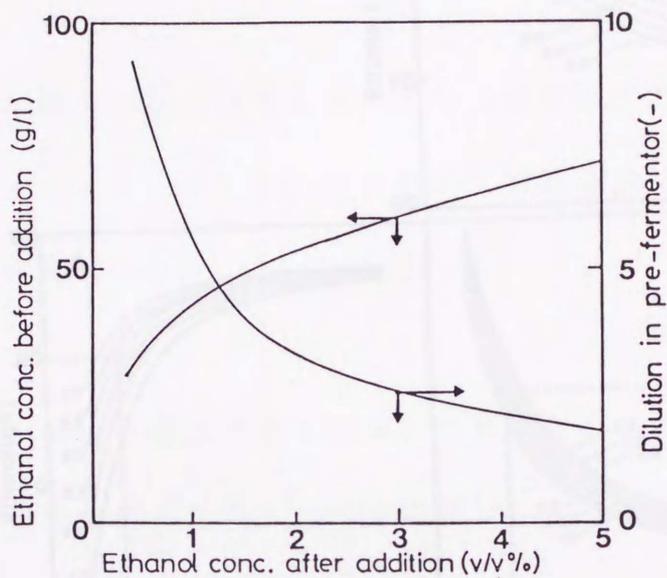


Fig. 7. Ethanol conc. before adding saccharified rice solution into the pre-fermentor, and dilution established in the pre-fermentor against ethanol conc. after the addition. These results were obtained by simulation analysis according to eqs. (4)-(6) and (27)-(30). Then, the ethanol conc. before and after the addition of saccharified rice solution reached definite values after 4-5 days at 20°C when the volume of saccharified rice solution (dilution) was fixed.

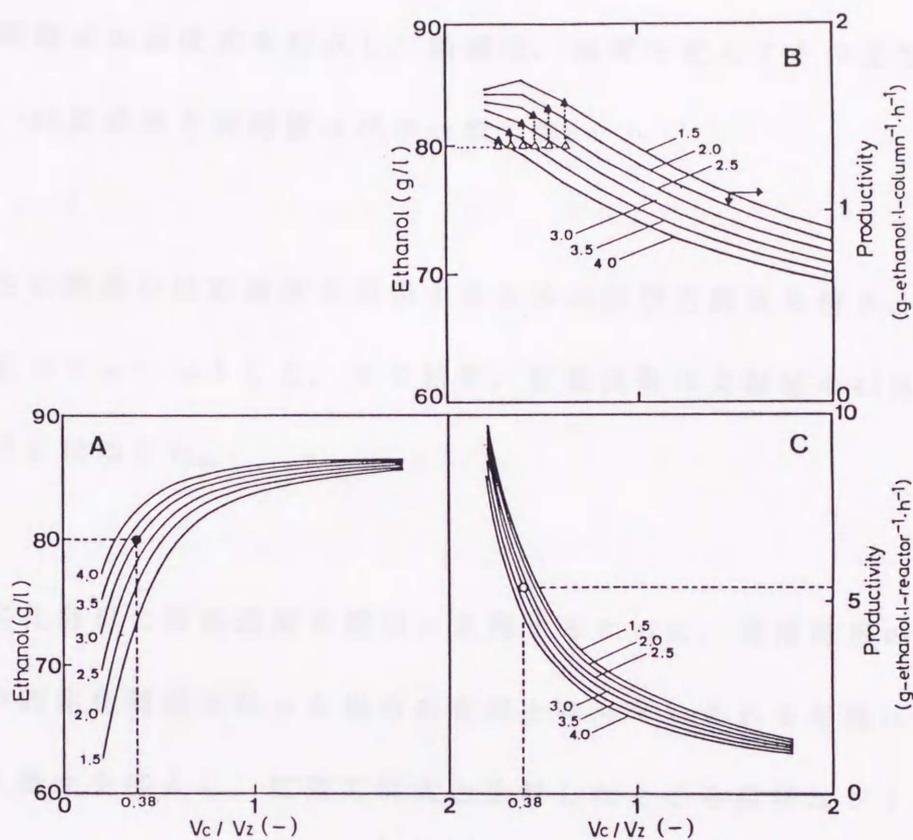


Fig. 8. Calculations of ethanol conc. in the column (A), ethanol productivity of the reactor (pre-fermentor + column) (B) and ethanol productivity of the column (C) against the ratio of the column and pre-fermentor (V_c/V_z). Parameters in the figures are ethanol conc. achieved after the addition of saccharified rice solution into the pre-fermentor (see Fig. 7). These results were obtained under the condition where $X_g = 120$ g/l, $S_0 = 200$ g/l, $V_g/V_c = 40\%$, $T = 293$ K, $A_x = 0.050$ and $A_p = 0.260$. Symbols: Δ , V_c/V_z for several ethanol concs. in the pre-fermentor when the ethanol conc. in the column was fixed at 80 g/l (graph A) were transferred to graph B; \blacktriangle , productivity of reactor in the above conditions (Δ); \bullet , V_c/V_z when the ethanol conc. in the column and the ethanol conc. after addition in the pre-fermentor were set at 80 g/l and 3.0% (v/v) (23.7 g/l), respectively; \circ , productivity of the column in the above conditions (\bullet).

要 約

1. 遊離酵母の速度式を作成し、糖濃度、温度を変えてその妥当性を検討したところ、計算結果と実測値はほぼ一致した。
2. 固定化酵母の反応速度を説明するために拡散方程式を解き、回分発酵の状態変化をシミュレートした。その結果、拡散係数は文献値の45%であり、実測値を良好に説明した。
3. 固定化酵母の反応速度を簡単に表現するために、遊離酵母の示す反応速度の何割が固定化酵母となった場合に有効となっているかを単純に示す、活性係数という概念を導入し、拡散方程式と比較したところ良好なシミュレーション結果が得られた。
4. 活性係数を導入した速度式を用い、前槽付き連続発酵槽の基礎的操作条件、前槽と固定化酵母カラムの比率を算出した。

記 号

A_1 : frequency factor of free cell growth, 1/h

A_2 : frequency factor of ethanol production by free cell, g/(g-cell·h)

A_x : activity coefficient of cell release from particle surface, -

A_p : activity coefficient of ethanol production by immobilized cell

D : dilution rate, $D = F / V$, 1/h

D_e : effective diffusivity of glucose and ethanol inside gel
containing cell, cm^2/h

D_0 : diffusivity of glucose and ethanol in water, cm^2/h

E_1 : activation energy of free cell growth, J/mol

E_2 : activation energy of ethanol production by free cell, J/mol

F : feed rate, l/h

$K_1, K_2, K_3, K_4, \alpha$: constant

K_s : saturation constant of free cell growth, g/l

K'_s : saturation constant of ethanol production by free cell, g/l

K_{s_i} : substrate inhibition coefficient of free cell growth, g/l

K'_{s_i} : substrate inhibition coefficient of ethanol production by free
cell, g/l

- P : ethanol concentration in broth, g/l
- P_r : ethanol concentration inside particle, g/l
- R_o : particle radius, cm
- R : gas-law constant, J/(mol·K)
- r : distance from center of sphere, cm
- r_p : overall reaction rate of ethanol production by a particle,
g/(cm²·h)
- r_s : overall reaction rate of substrate consumption by a particle,
g/cm²/h
- S : substrate concentration in broth, g/l
- S_g : total area at particle surface, cm²
- S_{in} : substrate concentration in feeding medium, g/l
- S_r : substrate concentration inside particle, g/ml
- T : absolute temperature, K
- t : time, h
- t_i : effective thickness of immobilized cell growth at particle
surface, cm
- V : working volume, l
- V_x : working volume of pre-fermentor, l
- V_c : working volume of column, l

- V_g : gel volume, l
 X : cell concentration in broth, g/l
 X_g : average cell concentration in gel, g/l
 X_m : maximum cell concentration in broth, g/l
 X_r : cell concentration inside particle, g/ml
 X_s : cell concentration at particle surface, g/ml
 $Y_{p/s}$: yield of ethanol against substrate, -
 μ : specific growth rate of free cell, $1/h$
 μ_g : specific release rate of yeast from gel, $1/h$
 μ_m : maximum value of μ , $1/h$
 μ_r : specific growth rate inside particle, $1/h$
 ν : specific ethanol production rate, $g\text{-ethanol}/(g\text{-cell}\cdot h)$
 ν_g : specific ethanol production rate by gel, $g\text{-ethanol}/$
 $(g\text{-immobilized cell}\cdot h)$
 ν_m : maximum value of ν , $g\text{-ethanol}/(g\text{-cell}\cdot h)$
 ν_r : specific ethanol production rate inside particle, $g\text{-ethanol}/$
 $(g\text{-cell}\cdot h)$
 ρ : specific substrate consumption rate, $g\text{-glucose}/(g\text{-cell}\cdot h)$
 ρ_g : specific substrate consumption rate by gel, $g\text{-glucose}/$
 $(g\text{-immobilized cell}\cdot h)$

B. ニューラルネットワークによるアルコール醗酵プロセスの菌体濃度の同定

本章のAでは、本清酒連続醗酵システムの工程の自動化のために、動力学的検討を行い、固定化酵母と遊離酵母の増殖及びアルコール生成速度式を構築した。

この動力学的検討に関連して、本章のBでは、アルコール醗酵プロセスの菌体濃度の同定を目的として、回分式のアルコール醗酵における菌体濃度変化を表現するシミュレーターの構築を検討した。

最近、ニューラルネットワーク（以下NNと略）を応用した手法が様々な産業分野に浸透し始めている^{17, 18, 19)}。この手法の最大の特徴は学習能力を持つことであり、この能力により、より高次の知識獲得を行うことができる。醸造分野では大石ら²⁰⁾が清酒の液化仕込における発酵の進みぐあいの早期判定に用いたという報告がある。

微生物反応プロセスは非線形性の高いプロセスであり、その数学モデルが多数報告されているが、モデル構築に当たりパラメーターを決定するために多くの実験を必要とする。さらに、多くの場合決定されたモデルが精密になるほど決定的なものとなり、プロセスのゆらぎに対応しにくくなる。

そこで、本章Bにおいて、NNの一つであるバックプロパゲーションを用いて、微生物反応プロセス同定を非常に簡単に行うことができ、かつ、容易にプロセスの変動に適応可能な方法を検討した。

回分型のアルコール発酵は、糖 (S) その他の基質を消費しつつ、菌体 (X) が増殖し、アルコール (P) を生産しながら、その増殖及び発酵が基質である糖により制限あるいは阻害を受け、さらに、アルコールによっても生産物阻害を受けるといふ代表的な微生物プロセスである。そのため、これらを厳密に表現しようとするならば少なくとも X 、 P 及び S の相互作用を解き明かし、速度式化しなければならない。しかし、その関係を簡単に考えるならば、 X 、 P 、 S の 3 つの入力から次の時間に、あるゆらぎを持つものの異なる 3 つの状態をとるといふ入出力関係であり、これら 3 つの状態をあるパターンであるとすれば、パターン認識において使用されるニューラルネットワークを用いてこの関係が説明できると考えられた。

実験材料として用いた菌株、培地及び分析方法は第3章に従った。また、用いたソフトウェアの全てはBasic言語により自作した。

結果と考察

1. ニューロシミュレーターの作成

入力層75、中間層40、出力層25の各ユニット数を持つ階層型NNであるバックプロパゲーション²¹⁾を用いた。プロセス同定のための流れ図をFig.9に示した。Table 2に示す様々なグルコース濃度の初期条件のもとに温度20℃一定条件でX, P, Sの分析値の時系列データをもとに次式²²⁾により近似した。

$$y = G / [1 + \exp\{f(t)\}] \quad (1)$$

$$f(t) = A_0 + A_1 t + A_2 t^2 + \dots + A_n t^n \quad (2)$$

ここで、yはX, P, Sのタイムコースを近似して得られる値、Gはyの最大値もしくは収束値を示す。またnは5次として計算した。A_nは多項式における係数である。

次に、データ群を正規化(無次元化)するために次式を用いた。

$$X_s = X / X_m \quad (3)$$

ここで X はある時刻における菌体濃度、 X_s はその正規化された量、また X_m は観察された全ての実験値よりも大きな値であり、今回は $X_m=400D^{660}$, 8.92g/l , $P_m=15\text{v/v}$, 118.4g/l , $S_m=200\text{g/l}$ とした。

まず、各時刻における正規化した菌体濃度、エタノール濃度、グルコース濃度をただちに入力層にセットすることを考え、各ユニット数が、入力層 3、中間層 20、出力層 1 の比較的簡単な NN を用意し学習させた。この時、3つの入力層のユニットには時間 t における X_s, P_s, S_s のアナログ値を入力し、その次の時間 $t+1$ の菌体濃度のアナログ値を出力層の一つのユニットから出力させた。教師信号は $t+1$ の時間における菌体濃度の正規化量とした。しかし、入力されるパターンに追従して行くだけで過去に学習させたパターンを次々に忘却するという結果であった。

この事は、微生物反応の持つ高い非線形性を再現しようとした場合、この程度のユニット数の NN では、入力される情報量の複雑さに対応できないと考えられた。これを解決するために、中間層の数を増やすことが考えられるが、入力される情報量は 3 つと限られているので、それには限界があると考えられた。

そこで、以下に述べる方法を用いた。まず、時間と正規化量の 2 次元空間をいくつかの小区間に分割し、ある時間における正規化量がどの小区間に属するかを判定し、正規化量を含む小区間には 1、含まない小区間には 0 を与えた。本実験では Fig.10 に示すように X, P, S の各々について同様に正規化量を 25 分割し、1 列あたり 0 または 1 を成分とする 25 の要素を持つベクトルを

3つ作成した。すなわちこのベクトルの1要素は2時間、正規化量0.04の範囲を持っている。また、式(1)、(2)を用いて得られた近似式を正規化した時、2時間ごとに離散的に得られる正規化量は1つであるから、列の中で成分1を持つ要素はただ1つとなっている。

以上のように作成した X 、 P 、 S のベクトルの列（ある時間における正規化量の0、1のパターン）の要素の合計は75であり、これをNNの入力層に入力した。この時出力層からの出力と教師信号は入力した列の次の列（次の時間）における X の25の要素であり、学習を繰り返すことにより、ある時間の菌体量が次の時間にどのようなようになるかを推定できると考えられた。

このような方法を用いることにより、3つのアナログ量を直接入力することに比べ、ユニットの数を増やすことができ、非線形なプロセスを表現できるようになると考えられた。また、1つのユニットが負担する情報量を減らすことができるはずである。

1. Time courses of X , P and S .
- ↓
2. Approximation of time course according to Eq.s (1) and (2).
- ↓
3. Standardization of process values according to Eq. (3).
- ↓
4. Making up data vector as pattern. (Fig.10).
- ↓
5. Setting up input data patterns (X_t, P_t, S_t) at time = t to input layer.
- ↓
6. Calculation of output data pattern (X_{t+1}) from output layer.
- ↓
7. Correction of weight and offset by teaching pattern (X_{t+1}).
- ↓
8. time = $t + 1$
- ↓
9. Iteration from 5 to 8 until the errors were satisfied.

Fig. 9. Construction procedure of the neural simulator.

Table 2. Initial conditions of the learning pattern. (g/l)

Pattern	S_0	X_0	P_0
1	50	0.4	0
2	100	0.4	0
3	140	0.4	0
4	150	0.4	0
5	170	0.4	0
6	200	0.4	0

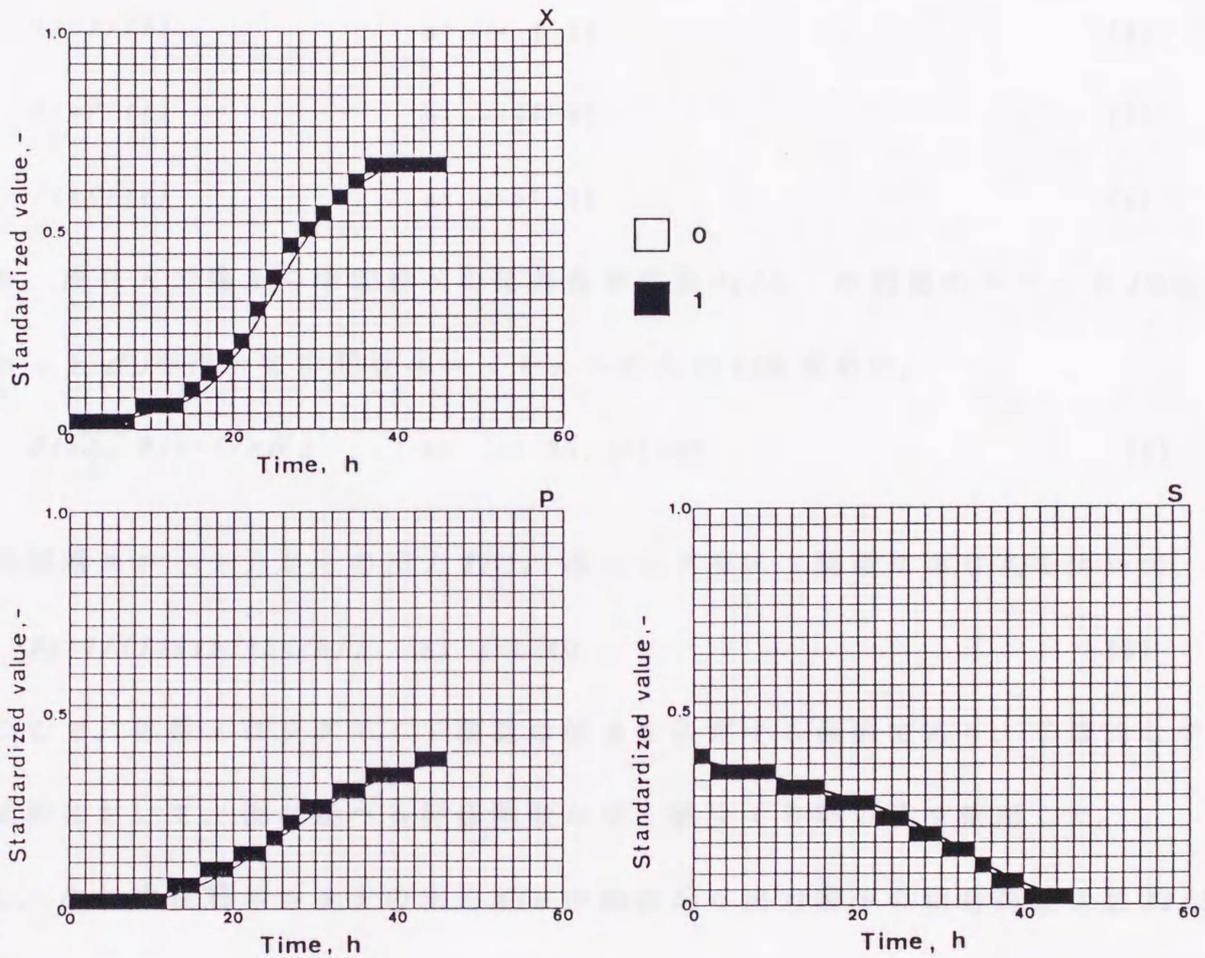


Fig.10. Patterns of X , P , and S .

Lines: approximated and standardized curves of measured values. Standardized values were divided into 25 areas. One time step is two hours. If an area included a standardized value at a step time, then it is shown as a black square, otherwise it is shown as a white one.

2. NNの学習

バックプロパゲーションで行った学習方法²³⁾は以下のように行った。

A. まず入力層からの出力 I_i に最初の時間の列の要素 $X_i(t)$ 、 $P_i(t)$ 、 $S_i(t)$ を入力した。

$$I_i = X_i(t) \quad \text{at } i = 1-25 \quad (4)$$

$$I_i = P_i(t) \quad \text{at } i = 26-50 \quad (5)$$

$$I_i = S_i(t) \quad \text{at } i = 51-75 \quad (6)$$

B. 次に入力層から中間層への結合荷重係数 W_{ji} と 中間層のユニット j のオフセット θ_j を用いて中間層ユニット j への入力 U_j を求めた。

$$U_j = \sum_i W_{ji} \cdot I_i + \theta_j \quad \text{at } i = 1-75, j = 1-40 \quad (7)$$

中間層ユニット j からの出力 H_j は、次のシグモイド関数により U_j を用いて、

$$H_j = 1 / \{1 + \exp(-U_j/a)\} \quad \text{at } j = 1-40 \quad (8)$$

ここで、係数 a はシグモイド関数の傾きを決定する係数であり、予備的な学習試験において、後に述べる評価関数が早く減少する時の値を使用した。

C. 次に中間層ユニットの出力 H_j と中間層から出力層への結合荷重係数 V_{kj} と出力層ユニット k のオフセット値 τ_k を用いて、出力層ユニット k への入力 S_k を求め、入力 S_k とシグモイド関数により出力 O_k を求めた。

$$S_k = \sum_j V_{kj} \cdot H_j + \tau_k \quad \text{at } j = 1-40, k = 1-25 \quad (9)$$

$$O_k = 1 / \{1 + \exp(-S_k/a)\} \quad \text{at } k = 1-25 \quad (10)$$

D. 学習における誤差を減少させるために次に示す評価関数 J を最小化するように W_{ji} , θ_j , V_{kj} , r_k の値を修正した。

$$J = \sum_p \sum_k (T_{pk} - O_{pk})^2 / 2 \quad (11)$$

ここで p は発酵開始から終了までの時間巾の数すなわち、ベクトルの列の数である。また、教師信号 T_k は、

$$T_k = X_k(t+1) \quad (12)$$

である。したがって、 T_k と O_k がほぼ等しくなったとき学習は完了したとみなした。今回の学習では評価関数 J の最小化に最急降下法を用いた。なお、出力値 O_k は、教師信号 T_k が 0 か 1 のどちらかであっても、0 と 1 の間の値をとることが多かった。

Table. 2 に示した 6 つのパターンを 1 つのニューロシミュレーターに学習させ、各パターンを 100 回づつ繰り返し、この時偏った学習を避けるため 10 回ごとにパターンを変えた。

3. NN を用いた菌体濃度のシミュレーション

学習後の NN を用いて学習に供したパターンを、菌体濃度の初期値のみを与えて菌体濃度をシミュレートした結果を Fig. 11 に示した。この時 P 及び S は実際のパターンを与えた。

菌体濃度のあるパターンをシミュレートする時、入力値として与える X , P ,

Sの各値が別のパターンの中のX、P、Sの各値と近い場合、それらの入力値に対応する教師データは当然近い値となる。このため、いくつかの菌体濃度のパターンを1つのニューロシミュレーターに学習させた結果、出力値は0-1の間の値をとり、いくつかの要素に分かれて出力された。そこで、菌体濃度の正規化量の推定値 $X(t+1)$ はファジイ制御における非ファジイ化にて使用されることの多い重心法、すなわち、25の出力値 Ok の一次モーメントを零次モーメントで割ることで決定した。

$$X(t+1) = \frac{\sum_k k \cdot Ok}{\sum_k Ok} \quad (13)$$

Fig.11の結果ではラグタイムを除いてシミュレートしてあり、ラグタイム期間ではX、P、Sの値は横ばい状態であるので学習が進まず良好な結果が得られなかったが、それ以外の結果は実際のデータをほぼ再現するものであった。Pattern1,2,4,6はタイムコース測定時に溶存酸素の影響を除くために、呼吸阻害剤であるAntimycin-Aを15ppm添加しているが²⁴⁾、この影響を受けて添加していないPattern3,5と比べてラグタイムが長くなり、増殖のカーブはこれら2つの中に違いが認められる。それにもかかわらず、いずれの場合もほぼ良好に菌体濃度を推定していた。

しかし、Fig.3中の矢印部分にみられるように、出力値 Ok の全てが0となり、菌体濃度を特定できない箇所があった。これは学習不足ということも考えられるが、他のパターンの中の似た入力値 Ii に対する教師信号 Tk が0であるという

学習によって打ち消されてしまったのではないかと考えられた。ここで、全ての出力値 OK が 0 であったことは次の時間の入力値 $X_i(t)$ もまた 0 であったと言うことである。それにもかかわらず、その後実測値に近い $X(t+1)$ の値を出力していた。このことは、 X の入力が無い場合でも、 P と S の入力値のみで菌体濃度 X を推定することができる可能性を示唆していた。

いずれにしても必ず正確な出力が得られることが望ましく、また、学習に用いたパターンには無い入力があった場合どのような出力となるのか、以下に述べる方法にてさらに詳しく検討した。

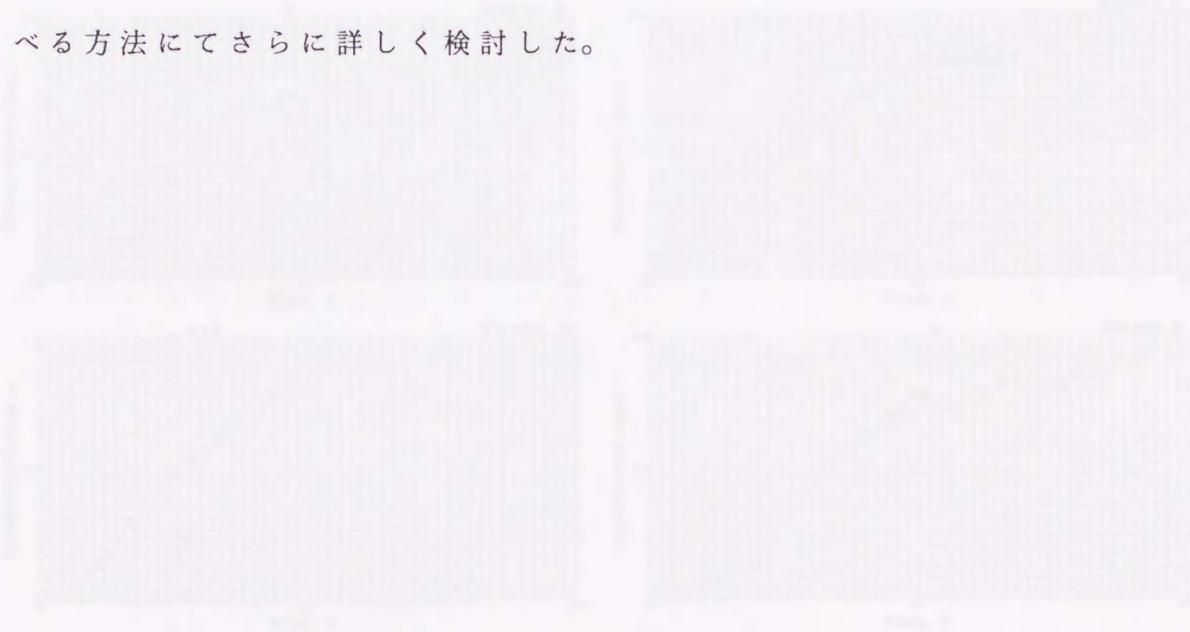


Fig. 11. Maximum results of neural simulation.

Fig. 11-1 and Fig. 11-2 show the maximum results of neural simulation. The data points are plotted on a grid. The y-axis is labeled '菌体濃度 X' and the x-axis is labeled '時間'. The data points are connected by lines, and error bars are shown for each point. The graphs show a general upward trend in bacterial concentration over time, with some fluctuations. The error bars indicate the uncertainty or range of the data points.

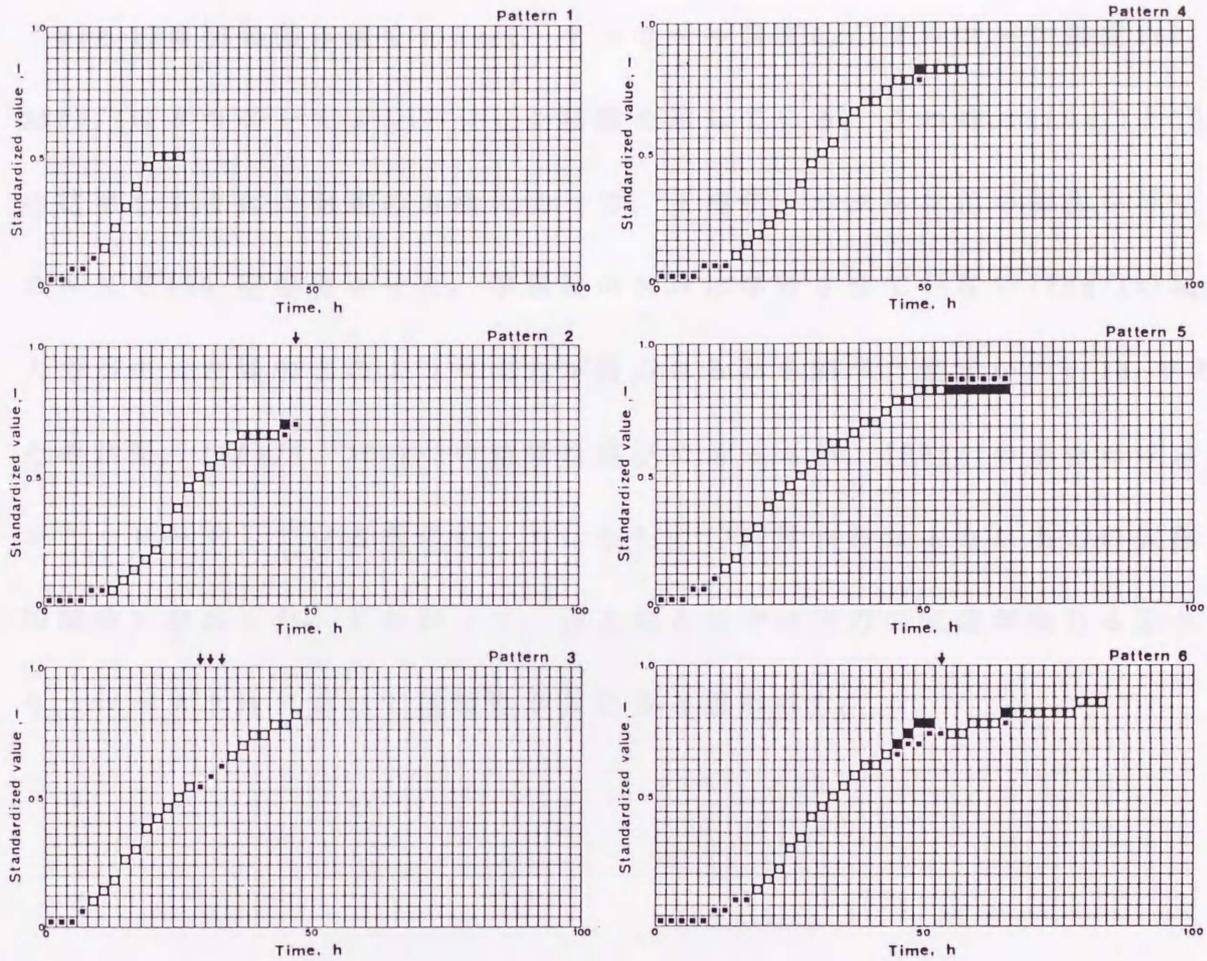


Fig.11. Simulation results of neural simulator.

Lag time was omitted from the calculation. Symbols: \blacksquare , original data; \square , conformity of original data and simulated data; \blacksquare , non-conformity of original data and simulated data. Patterns are according to Table 2. Arrows indicated no-output from output layer.

4. シミュレーターのロバスト性の確認

本章 A で報告したアルコール発酵の速度式のシミュレーション結果を用いて、学習していない入力があった場合どのような出力が得られるかを確認した。

Fig.12は初発菌体濃度0.5g/l、アルコール濃度0g/lグルコース濃度160,180,200g/lの3つのシミュレーション結果を示している。この時、160g/lと200g/lの結果をもとに、前述の方法に従って、正規化、パターン化の操作を行い上記のNNで150回学習させた。学習後のNNに学習させていない180g/lの場合の入力があった場合どのような出力が得られるかを調べた結果がFig.13である。その結果、160g/l、200g/lの結果は良好であったが、180g/lの場合ほぼ良好にシミュレートしているものの、やはりFig.11に見られたような出力の欠落（矢印部分）があった。したがって、以上の方法では出力の欠落が生じる恐れがあり、ロバスト性において信頼性が欠けると思われた。

Fig. 12. Simulation results of neural simulator.
The neural simulator learned the pattern of \ln
160 g/l and 180 g/l in Fig. 11, and simulated the
normalized pattern of 180g/l. Results and errors
are the same as in Fig. 11.

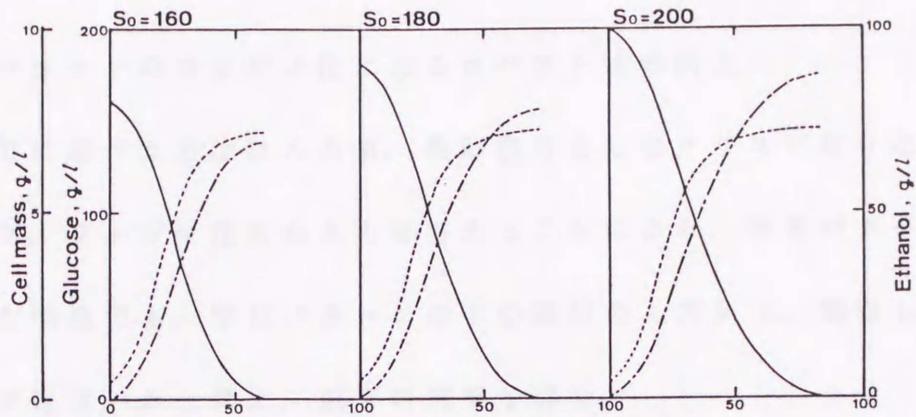


Fig.12. Simulation results of mathematical model.
 S_0 is the initial glucose condition.
 Lines: - - - - - , cell; - · - · - · , ethanol; ——— , glucose.

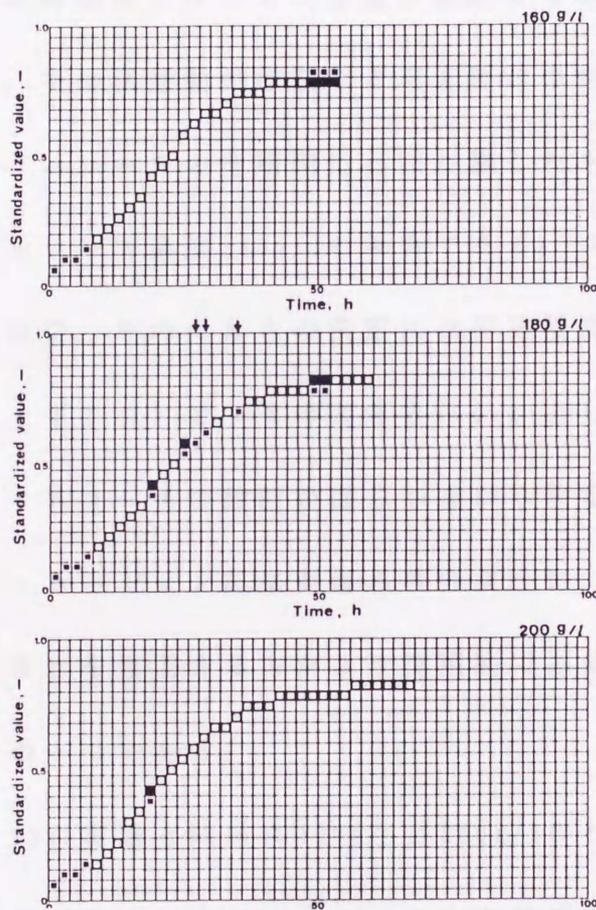


Fig.13. Simulation results of neural simulator.
 The neural simulator learned the pattern of $S_0 = 160 \text{ g/l}$ and 200 g/l in Fig.12, and simulated the non-learned pattern of 180 g/l . Symbols and arrows are the same as in Fig.11.

5. 学習パターンのファジィ化によるロバスト性の向上

以上までに述べた方法は入力値、教師信号としてクリस्पな0と1の値を与えていたが、ファジィ化した入力を与えることにより、学習パターンに無い入力があった場合でも、学習パターンの中の類似の入力から、類推した出力が得られるのではないかと考え、以下の結果を得た。

ある時間における入力ベクトルの列は Fig.10 のようにクリस्पに表現する代わりに、その時間にとりうる状態量の変動する場合を考慮してファジィ化することにより、その状態量が存在する可能性の巾を広げることとした。この操作を菌体のタイムコースの全期間にわたり施したものを Fig.14 に示すが、これは上記のグルコース濃度160g/lの場合である。ファジィ化に当たり今回はそのファジィ化の巾、その大きさの決定には何等根拠はなく、テストケースとして小さい巾（上下1つ）で、その大きさは0.2とした。これらの決定には、同じ条件でのタイムコースの数回のばらつきから決定することも考えられるが、より良いシミュレーション結果が得られるように、フィードバックしてファジィ化の巾と大きさを修正する方がより実用的であると考えられる。この点は今後の検討事項の一つである。

次に、Fig.13の実験と同様に160g/lと200g/lのパターンを学習させ、学習させない180g/lのパターンをシミュレートした結果がFig.15である。学習時に X 、 P 、 S のファジィ化した入力値を用い、教師信号にはクリस्पな X の値を用いた。シミュレーション時には Fig.13 と同様にクリस्पな P と S の値及び X の

推定値を用いた。その結果、いずれの条件でも良好に、出力の欠落もなくシミュレートしており、本方法によりシミュレーターのロバスト性を向上させることが可能となり、学習していない状態の入力があつた場合でも実測値に近い推定値を出力することができた。

以上のようにNNを用いて菌体濃度のシミュレーターを構築することが可能であつた。この手法を利用すればいくつかのタイムコースをもとに非常に短時間にプロセスの動特性を把握できるであろうし、制御中に菌体濃度を推定することにも利用可能であると考えられた。

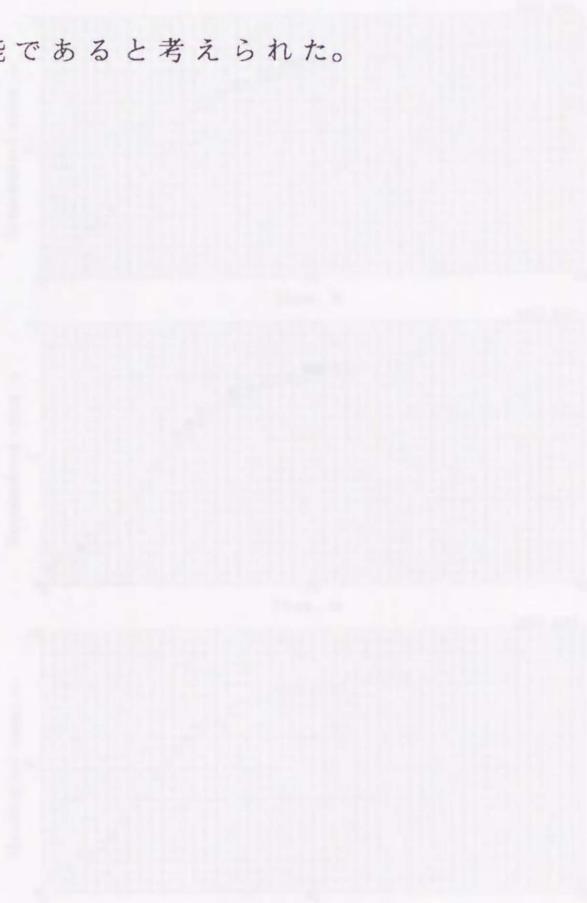


Fig. 11. Simulation results of trained neural simulator. The trained neural simulator learned the process of A_{410} 2/7 and 2/8 in Fig. 10, and simulated the non-trained process of 1/24/4. Symbols are the same as in Fig. 10.

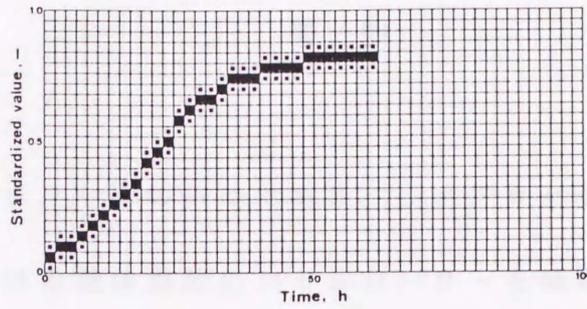


Fig. 14. Fuzzied pattern of the standardized cell concentration in Fig. 12 ($S_0=160\text{ g/l}$). The large black square are element 1 and the small black square are element 0.2.

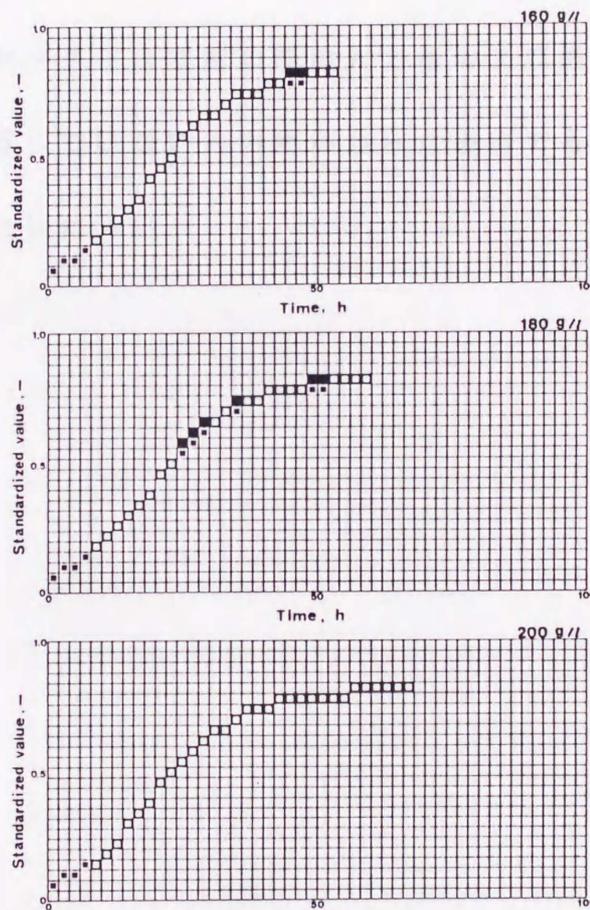


Fig. 15. Simulation results of fuzzied neural simulator. The fuzzied neural simulator learned the pattern of $S_0 = 160\text{ g/l}$ and 200 g/l in Fig. 12, and simulated the non-learned pattern of 180 g/l . Symbols are the same as in Fig. 11.

要 約

ニューラルネットワークの一つであるバックプロパゲーションを用いて、アルコール発酵における菌体濃度のシミュレーターを構築した。ある時間におけるデータ空間を分割し、菌体濃度、アルコール濃度及びグルコース濃度のパターンを入力値として与え、直後の時間における菌体濃度を教師データとして学習を繰り返したところ、実データを良好にシミュレートすることができた。また、そのシミュレーターは学習の際の入力値および教師信号をファジィ化することにより、学習していない入力値があった場合でも実測値に近い出力を行い、ロバスト性が向上した。

記 号

- A_n : coefficient of polynominal equation eq.(2), -
- a : coefficient of sigmoidal function of eq.(8), -
- G : maximum value of y , g/l
- H_j : output from j th unit at hidden layer, -
- I_i : output from i th unit at input layer, -
- J : error function of learning, -
- O_k : out put from k th unit at outer layer, -
- P : ethanol concentration, g/l
- S : glucose concentration, g/l
- S_k : input to k th unit at output layer, -
- T_k : teaching value for learning
- t : time, h
- U_j : input to j th unit at hidden layer, -
- V_{kj} : weight from j th unit at hidden layer to k th unit at output layer, -
- W_{ji} : weight from i th unit at input layer to j th unit at hidden layer, -
- X : cell concentration, g/l

X_m : value more than maximum cell concentration, g/l

X_s : standardized cell concentration, -

$X_i(t)$: i th value in a vector column for standardized cell concentration at time = t , -

$X(t+1)$: simulated and standardized cell concentration at time = t , -

y : stated variable(X, P, S), g/l

r_k : offset in k th unit, -

θ_j : offset in j th unit, -

i : counter variable at input layer, -

j : counter variable at hidden layer, -

k : counter variable at output layer, -

p : counter variable for calculation of error function, -

文 献

- 1) Nagatani, M., Shoda, M., Aiba, S. : *J. Ferment. Technol.*, **46**, 241-248 (1968)
- 2) Edwards, V. H., Wilk, C. R. : *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 205-214 (1968)
- 3) Nanba, A., Nishizawa, Y., Tsutiya, Y., Nagai, S. : *J. Ferment. Technol.*, **65**, 277-283 (1987)
- 4) Ghose, T. k., Tyagi, R. D. : *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1401-1420 (1979)
- 5) 田中信哉、杉本芳範、鈴木良子、古川彰久、渡辺和夫、吉田敏臣、田口久治 : 醱酵工学、**62**、391-399 (1984)
- 6) Lee, J. M., Pollard, J. F., Coulman, G. A. : *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 497-511 (1983)
- 7) 永谷正治 : 醱酵工学、**51**、205-208 (1973)
- 8) 佐藤和夫、宇都宮仁、近藤恭一、三島秀夫、竹内成三、吉澤淑 : 醱酵工学、**68**、25-29 (1990)
- 9) Sato, K., Toda, K. : *J. Ferment. Technol.*, **61**, 239-245 (1983)
- 10) Toda, K., Sato, K. : *J. Ferment. Technol.*, **63**, 251-258 (1985)
- 11) Furusaki, S., Seki, M. : *J. Chem. Eng. Japan*, **18**, 389-393 (1985)
- 12) Seki, M., Furusaki, S. : *J. Chem. Eng. Japan*, **18**, 461-463 (1985)
- 13) Ryu, D. D. Y., Kim, H. S., Taguti, H. : *J. Ferment. Technol.*, **62**, 255-261 (1984)
- 14) Wada, M., Kato, J., Chibata, I. : *J. Ferment. Technol.*, **58**, 327-331 (1980)

- 15) 長棟輝行、遠藤 勲、井上一郎：化学工学論文集、9、455-461 (1983)
- 16) 佐藤和夫、吉沢 淑、西谷尚道：醸協, 86, 745-749 (1990)
- 17) Miyamoto, H., Kawato, M., Setoyama, T. and Suzuki, R.: *Neural Networks*,
1, 251-265 (1988)
- 18) 西村和夫、川崎美穂：電気学会情報処理研究会、11-20、(1988)
- 19) 松田 聖、穂本 能：平成元年電気学会全国大会要旨集、1567、(1989)
- 20) 大石 薫、富永光則、川戸章嗣、安部康久、今安 聰：平成二年度醗酵工学大
会要旨集、139 (1990)
- 21) Rumelhart, D. E., Hinton, G. E. and Williams, R. J.: *Nature*, 323, 533-536
(1986)
- 22) Edwards, V. H., Wilk, C. R.: *Biotechnol. Bioeng.*, 10, 205-214 (1968)
- 23) ニューロンネットグループ：ニューロコンピュータ、技術評論社 (1989)
- 24) 高松 智、吉田敏臣、上田隆蔵、田口久治：発酵工学、52, 190-195 (1974)

清酒の連続醗酵におけるオンライン制御

第 4 章では、清酒の連続醗酵の動力的検討を行い、前槽中の遊離酵母の増殖および醗酵速度式、糖およびアルコールの固定化酵母ゲル中の拡散抵抗等を考慮した通常モデル、および、活性係数という新しい概念を用いて簡素化したモデルについて、本連続醗酵系の運転で得られる実測値との整合性を検討し、この簡素化モデルにより良好なシミュレーションが可能であることを検証した。また、このモデルを用いて本システムの操作条件と必要な装置容量が算出できることを示した。

一方、杜氏の高齢化や慢性的な人手不足などを考えると、本バイオリアクターシステムのオンライン制御は、実現すべき課題であった。

そこで、第 5 章においては、バイオリアクターシステムのオンライン計測および自動制御のために、本章 A では、連続醗酵槽内のアルコール濃度を質量流量計を用いて、発生する炭酸ガスを測定することにより、アルコール濃度を推定する方法の開発を目指した。これに続く、本章 B では、バイオリアクターによる清酒の連続醗酵を、オンラインアルコール濃度測定法を用いて、前槽は適応制御で、リアクターはファジィ制御でオンライン運転するための方法の開発を目指した。

A. 質量流量計を使用したアルコール濃度のオンライン測定

清酒醸造においてアルコールの計測は最大の要点であり、そのオンライン計測の試みがいくつか報告されている。近藤ら^{1), 2), 3)}は従来の清酒醸造に於て、自動サンプリング装置、チュービングセンサー法、超音波音速度計を、大石ら⁴⁾は液化仕込みにおいて振動式密度計により醪中のアルコール濃度及び比重を正確に測定し得ることを報告している。

今安ら⁵⁾、柴田⁶⁾は、清酒醸造も含めた回分発酵におけるアルコール濃度の測定が、発生するCO₂ガスを測定することによって可能であることを報告しているが、連続発酵方式におけるアルコール濃度の測定に関する報告はない。これは槽からの発酵液の流出、希釈を伴うため回分発酵における方法が適用できないためである。

本バイオリアクターシステムのオンライン制御のためには、アルコール濃度センサーが不可欠である。醪液中のアルコール濃度を直接オンラインで測定する方法としては、分離膜を装着したオンラインセンサーを用いる方法と、自動サンプリング装置を介してオートサンプラーに濾過液を導入し、HPLCで測定する方法が考えられる。しかし、前者は醪液中のエキス分により、アルコールの膜透過性が変化し、測定値が影響されるという欠点がある。後者は、フィルターが目詰まりを防止するため蒸気等による定期的な逆洗が必要であり、またシステムが複雑で高価となるという欠点がある。

そこで、本章 A では、醗酵液中のアルコール濃度を、同時に発生する炭酸ガス濃度から、間接的に推定する方法を新たに開発することとした。すなわち、質量流量計を用いた炭酸ガス発生速度の監視により、連続醗酵槽内のアルコール濃度をオンライン測定する系を構築することを目指した。

2. 2. 1 概要

本章では、連続醗酵槽内のアルコール濃度を、同時に発生する炭酸ガスの発生速度から推定する方法を開発することとした。すなわち、質量流量計を用いた炭酸ガス発生速度の監視により、連続醗酵槽内のアルコール濃度をオンライン測定する系を構築することを目指した。

本章では、連続醗酵槽内のアルコール濃度を、同時に発生する炭酸ガスの発生速度から推定する方法を開発することとした。すなわち、質量流量計を用いた炭酸ガス発生速度の監視により、連続醗酵槽内のアルコール濃度をオンライン測定する系を構築することを目指した。

本章では、連続醗酵槽内のアルコール濃度を、同時に発生する炭酸ガスの発生速度から推定する方法を開発することとした。すなわち、質量流量計を用いた炭酸ガス発生速度の監視により、連続醗酵槽内のアルコール濃度をオンライン測定する系を構築することを目指した。

2. 2. 2 装置

本章では、連続醗酵槽内のアルコール濃度を、同時に発生する炭酸ガスの発生速度から推定する方法を開発することとした。すなわち、質量流量計を用いた炭酸ガス発生速度の監視により、連続醗酵槽内のアルコール濃度をオンライン測定する系を構築することを目指した。

2. 2. 3 結果

本章では、連続醗酵槽内のアルコール濃度を、同時に発生する炭酸ガスの発生速度から推定する方法を開発することとした。すなわち、質量流量計を用いた炭酸ガス発生速度の監視により、連続醗酵槽内のアルコール濃度をオンライン測定する系を構築することを目指した。

実験材料と方法

供試菌株

S. cerevisiae kyokai-701を用いた。

培地組成

半合成培地として、1ℓ中 KH_2PO_4 5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2g、ポリペプトン 10g、酵母エキス 5gを含むものを用いた。糖化液は第2章に従い調製した。

固定化酵母

担体としてアルギン酸ナトリウム3%、塩化カルシウム2%を用い、第2章に従い調製し、これを前培養後4℃にて保存し、適宜使用した。

分析

エタノールはガスクロマトグラフィーを用いて測定した。

装置

連続発酵槽から発生する CO_2 を測定するために、発酵槽から流出する気液混合状態の発酵液をガス液分離装置に導き、大半の CO_2 ガスを分離した。本装置の概略図をFig. 1.に示すが、発酵液はまず槽Aに入り、ここで液は管Bを通り

槽 C に落下し、槽 C での増分は貯蔵槽に送られる。一方槽 A 中のガスが槽 C へ移動しないよう槽 C 内の液部が示す管 B への圧力が、ガスが槽 C へ与える圧力に勝る程度に十分量の容積を槽 C が持つように製作した。ガス液分離装置は以上のように構成し、流出する液部に溶存する CO₂ は測定しておらず、誤差要因として振舞うと考えられるため後述の校正方法を用意し、誤差を吸収することとした。

槽 A から流出するガスを 60% 硫酸水溶液槽を通過させることにより水分を除いた。なお回分発酵槽及び前槽から発生するガスは直接硫酸槽に導いた。ガス流速は KOFLOC 社製質量流量計にて測定した。本装置の示す流速値は 20°C、1 気圧における値として出力され、A/D コンバータを介してコンピュータに取り込み、温度データ、通液速度とともに保存した。

1. アルコール濃度推定式

A. 回分発酵槽

回分発酵におけるアルコール濃度の測定にはいくつかの報告があるが、杉本ら⁷⁾は次の式により測定可能であったと報告している。回分発酵におけるアルコール生成に関する状態方程式は、

$$dP/dt = \nu X \quad (1)$$

であり、ここで、 t は時間、 P はアルコール濃度、 X は菌体濃度、 ν は比生成速度である。アルコール生成は化学量論的に CO_2 生成と比例関係にあるとして、(1)式は次のように書き換えられる。

$$dP/dt = KV_{CO_2}/V \quad (2)$$

ここで、 V_{CO_2} は CO_2 発生速度、 K は定数であり、今、換算定数と呼び、単位 CO_2 発生量当りのアルコール生成量を示す。 V は発酵液容量である。(2)式を時間 t_0 から t まで積分すると、

$$P_t = P_{t_0} + K/V \int_{t_0}^t V_{CO_2} dt \quad (3)$$

すなわち、ガス積算量(流量)はアルコール濃度の増加量と比例関係にあることを示している。この式を用いて、回分発酵におけるガス発生速度の積算値

とアルコール濃度を測定した結果をFig. 2 に示した。容量300mlの三角フラスコに半合成培地300mlを入れ、室温にて発酵させた。ほぼ、その関係は直線的であるが、図中矢印で示した部分を境として、わずかにその傾きが変化していることが観察される。

前半部の傾きは $K = 1.99(\text{g-ethanol/l-CO}_2\text{gas})$ 、後半部は 1.69 であった。これは、増殖にともなう発酵により生ずる、 CO_2 の寄与が矢印部分を境として無くなったか、あるいは少なくなったため⁸⁾ であると推察できる。また、 CO_2 ガスとアルコールが等モル生成するとすると20℃、1気圧でその傾きは1.91であるが、得られた値はこれに近いものであった。

完全な回分発酵においてはこのことを考慮した上で適用すべきであるが、清酒醸造では主発酵期間である留時以降の酵母増殖はほとんどなく、また、今回の装置はアルコール濃度が前槽に於て2-5v/v% (15.8-39.5g/l)、カラムに於て10v/v% (79g/l)前後になるよう運転されるので、前槽では増殖が寄与する発酵、カラムにおいては増殖が寄与しない発酵が生じているとみなして今回この事は無視した。

B. 前槽

第2章の発酵システムは前槽において繰り返し回分発酵を行っているが連続的に抜取りを行いつつ、固定化酵母充填カラムに通液している。このため、前槽では液量の減少を考慮する必要があったので次の式によった。

$$P_t = P_{t0} + K_1 \int_{t0}^t V_{CO_2} / V_t dt \quad (4)$$

ここで、 V_t は時間 t における液量を示しており、換算定数 K_1 は他の発酵形式における定数と便宜上区別するため添え字をつけた。Fig. 3に式(4)に基づき前槽における液量の減少を考慮した CO_2 発生量とアルコール濃度の増加量をプロットした。この結果は2.61容ミニジャーを用い、温度が10-25 °Cの間で変動し、初発仕込量1.51の前槽から流速0-0.041/h で抜取りを行った場合のものである。この時1日に一度抜き取った量に等しい培地を供給した。

アルコール濃度の実測値の中に測定誤差 ($\sigma_{n-1}=0.1137$) が含まれているため、若干のばらつきがあるものの、良好な直線関係が得られた。また、この時換算定数 K_1 は半合成培地を用いた場合 $K_1=2.62$ (図中○) であり糖化液を用いた場合2.75 (●)、2.96 (□) と求められ、3回の実験結果とも大差なく、全てのデータを用いた場合2.71となった。したがって、液量を考慮することにより、抜取りをともなう発酵に関しても発生ガスの測定により生成するアルコール濃度を推定できることが分かった。

しかし、Fig. 2 で得られた値1.69及び1.99、また、理論値1.91と比べかなりの差があり、発酵槽を開放し培地供給を行う際に添加した培地量の分だけ発生ガスを小さく見積ったため大きな値となったと考えられた。

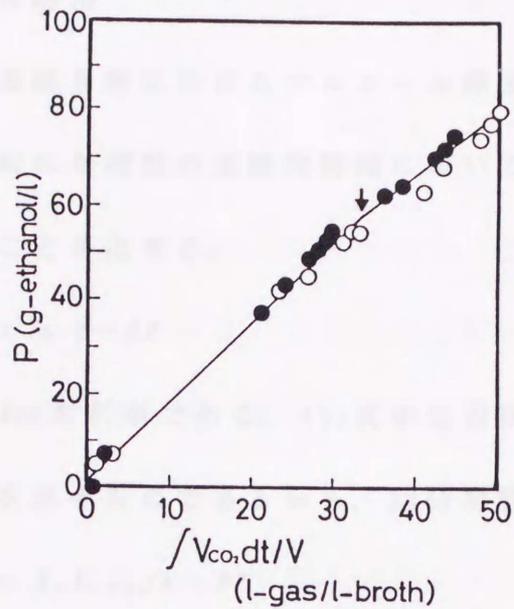


Fig. 2. Relationship between evolved CO_2 gas volume and produced ethanol in batch fermentation at room temperature. The arrow indicates the turning point of the slope. Two mass-flow meters were employed; \circ and \bullet .

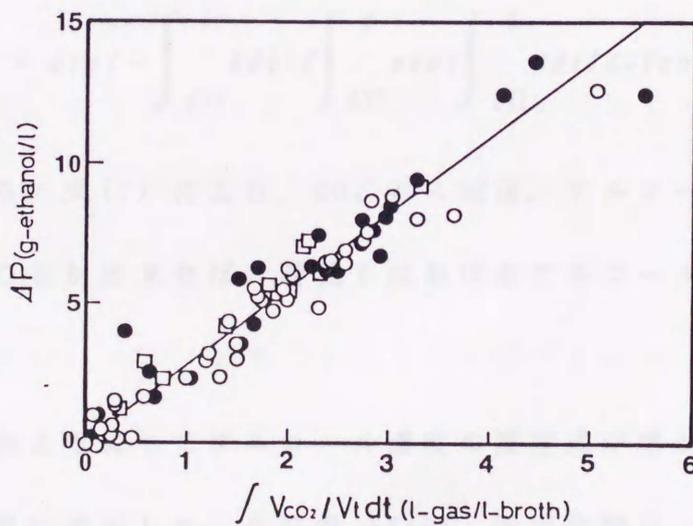


Fig. 3. Relationship between evolved CO_2 gas volume and produced ethanol in the pre-fermentor operated by the repeated fed-batch method. Symbols are the results of different experiments; \circ , \bullet , and \square .

C. 連続発酵槽

次に、連続発酵におけるアルコール濃度のオンライン測定方法について検討した。一般に単槽型の連続発酵槽において、物質収支に基づく速度式は次のように示すことが出来る。

$$dP/dt = \nu X - DP \quad (5)$$

ここで、 D は希釈率である。(5)式中右辺第一項は菌体によるアルコール濃度の増加速度を示すものであるから、回分発酵の式(1)、(2)をもとに書き換え、

$$dP/dt = K_2 V_{CO_2}/V - DP \quad (6)$$

式(5)における X は、より一般化したものとして、遊離酵母および固定化酵母の両方を含むものとして取り扱った。さて、式(6)を非同次型の微分方程式として積分すれば、時間 t におけるアルコール濃度 P_t は

$$P_t = \exp\left(-\int_{t_0}^t D dt\right) \left\{ \int_{t_0}^t \exp\left(\int_{t_0}^t D dt\right) K_2 V_{CO_2}/V dt + P_{t_0} \right\} \quad (7)$$

すなわち、式(7)により、 CO_2 ガス流速、アルコール濃度の初期値及び希釈率を知ることが出来れば、時間 t におけるアルコール濃度を知ることが可能となる。

以上のようにしてアルコール濃度の推定式が導かれたので、実際に連続運転した結果に適用した。全容量 565ml、固定化酵母 105mlの連続発酵槽を用意し、グルコース濃度 200 g/lの半合成培地を通液しながら、アルコール濃度がほぼ

8 v/v% (63.1g/l)となるよう希釈率(流速)を適宜変えた実験結果をFig.4に示した。

実験は、10, 15, 20, 25℃にてそれぞれ行った。CO₂発生速度はコンピュータに取り込まれた後、台形公式にて積分し、希釈率とともに保存した。実験終了後、保存しておいたアルコール濃度の初期値、希釈率、ガス流量より、式(7)を用いて実測値と推定値の差の二乗和が最小となるように換算定数を決定した。その換算定数は温度の影響を受けていることが明らかであったが、一旦換算定数が決定されれば良好に実測値を説明していることが分かった。

Fig.4の結果をもとに、温度の対数値と換算定数をプロットしたところ(Fig.5)、相関係数が最大となったので、次の経験式により温度補償を行うこととした。

$$K_2 = K_3 \log(T) + K_4 \quad (8)$$

ここで、 T は温度(℃)であり、 K_3 、 K_4 は定数であり、それぞれ1.01、0.402と求められた。換算定数 K_2 が温度に影響を受ける理由について次のことが考えられた。温度により発酵槽内の気体状CO₂の量が異なるため槽内の液正味量に変化していたのか、発酵液とともに流出する溶存CO₂が温度に影響を受け、流量計で測定するガス流量を小さくあるいは大きく見積ってしまったと考えられた。

式(7),(8)において、希釈率が $D=0$ の場合、回分発酵における式とみなすことができる。そこで、前槽において温度を変えた場合、換算定数が影響を受け

るか否かを調べてみた。前述のミニジャーにて各温度一定条件に保ちつつ流速 0.01-0.02(1/h)で抜取りを行った。この時培地の補給は行わなかった。

その結果、Fig.6 に示すように前槽に関して換算定数は影響を受けず一定値とみなして差し支えないと思われた。この時の傾きは $K_1=1.73$ であり理論値1.91 に近い値が得られた。連続発酵槽の場合、希釈されていること及び、発酵液が流出しているという事実が温度補償の必要性を生じせしめている原因であると考えられた。



Fig. 6. Simulation analysis of continuous fermentation with immobilized plant cells according to Eq. (1). Lines were calculated from the dilution rate (dilution rate divided by tank volume) and gas flow rate. Symbols are measured values. Correction constants, K_2 , were decided at various temperatures by the shooting method, i.e. iteration until the square sum of differences of the simulated and measured values were minimum. P_1 , ethanol conc.; P_2 , feed rate; V_{CO_2} , CO_2 flow rate every 10 minutes.

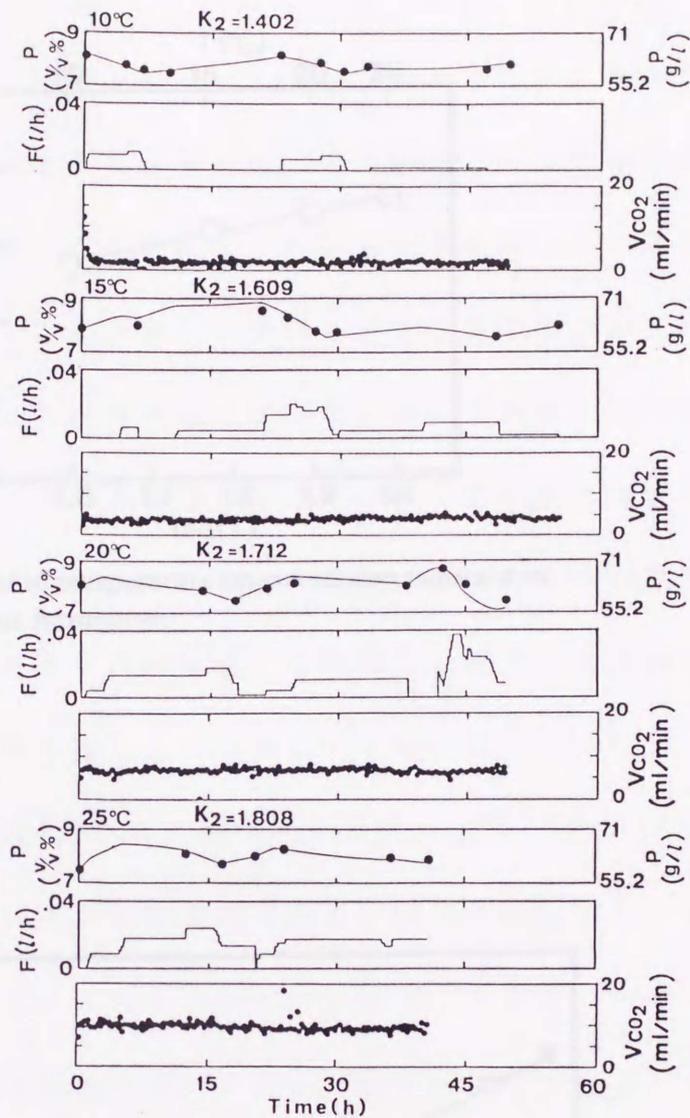


Fig. 4. Simulation analysis of continuous fermentation with immobilized yeast cells according to Eq. (7). Lines were calculated from the dilution rate (feed rate divided by broth volume) and gas flow rate. Symbols are measured values. Conversion constants, K_2 , were decided at various temperatures by the shooting method, i.e. iteration until the square sums of differences of the simulated and measured values were minimum. P, ethanol conc.; F, feed rate; V_{CO_2} , CO_2 flow rate every 10 minutes.

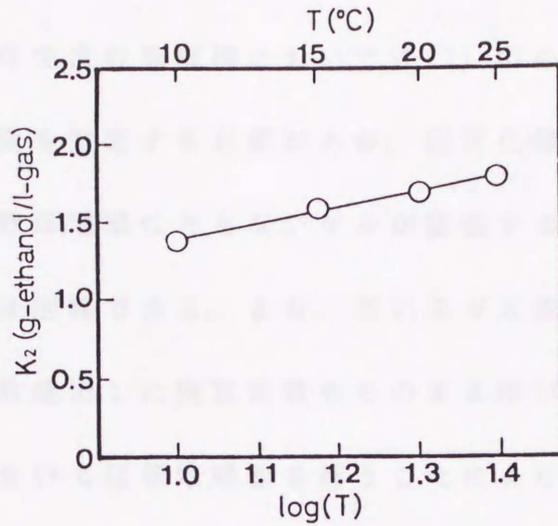


Fig. 5. Effect of temperature on conversion constant in continuous fermentor.

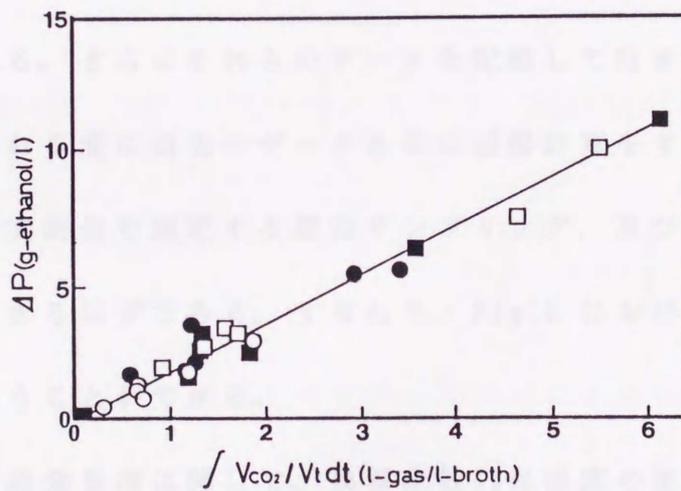


Fig. 6. Effect of temperature on conversion constant in the pre-fermentor operated by the repeated fed-batch method.

Symbols: ○, 10°C; ●, 15°C; □, 20°C; ■, 25°C.

2. 換算定数の同定方法

固定化酵母を含む発酵槽において式(7)中の希釈率を知るためには固定化酵母ゲルの容量を測定する必要があるが、固定化酵母ゲルの容量は、固定化後の前培養により酵母増殖にともないゲルが膨張するため、その割合をあらかじめ予測することは困難である。また、用いるガス流量計を使用前に厳密に校正しなければ、以前使用した換算定数をそのまま用いる場合には危険をとまなう。また、前槽においては培地補給を行うことにより誤差要因が増す。

以上のような理由により、いかなる状態にあっても本測定系を使用可能とするために運転途中にアルコール濃度の実測値を与えれば換算定数を適宜同定するような機能を持たせることが望ましいと考えた。

前槽においては式(4)中のアルコール濃度の上昇、 $(Pt - Pt0)$ に対するその間の液量考慮済みのガス発生量の間で線形の回帰計算を行うことで換算定数が同定可能である。さらにそれらのデータを記憶して行き、新しいアルコールの実測値が得られる度に過去のデータと共に回帰計算をするという手順を繰り返し学習すれば実測値を測定する際のサンプリング、及び分析誤差による同定誤差を小さくできるはずである。すなわち、Fig. 3における傾きが同定済みの換算定数 K_1 とすることができる。

一方、連続発酵槽に関して、換算定数 K_2 は温度の影響を受け式(8)のようになることを示したが、式(7)を K_3 と K_4 由来の項に整理しなおして次の式のように書き換え換算係数同定に使用することがまず考えられる。

$$\begin{aligned}
 P_t / \exp\left(-\int_{t_0}^t D dt\right) - P_{t_0} &= K_3 \int_{t_0}^t \exp\left(\int_{t_0}^t D dt\right) \log(T) V_{CO_2} / V dt \\
 &+ K_4 \int_{t_0}^t \exp\left(\int_{t_0}^t D dt\right) V_{CO_2} / V dt \quad (9)
 \end{aligned}$$

式(9)中の左辺の値とその時の右辺第一項中の K_3 以外の部分を回帰計算し得られた傾きを K_3 とし、切片を式(9)中の右辺第二項の K_4 以外の部分で除した値を K_4 とすれば同定可能であると考えられる。望ましくは式(9)を用いて係数同定を行うべきであるが、実際には連続発酵槽内の温度はごく限られた範囲でしか変動しないので、回帰計算でこれらの換算定数 K_3 、 K_4 を同定することは誤差が大きくなる恐れがあると思われた。そこで、今回は、換算定数の温度に対する影響は変動しないとみなし、 $K_3=1.01$ として固定し、 K_4 のみを同定することとした。式(9)を再度書き換えて、

$$\begin{aligned}
 P_t / \exp\left(-\int_{t_0}^t D dt\right) - P_{t_0} - K_3 \int_{t_0}^t \exp\left(\int_{t_0}^t D dt\right) \log(T) V_{CO_2} / V dt \\
 = K_4 \int_{t_0}^t \exp\left(\int_{t_0}^t D dt\right) V_{CO_2} / V dt \quad (10)
 \end{aligned}$$

とすることにより、式(10)の左辺と右辺中の K_4 を除く部分を回帰計算に適用し、その傾きをとれば換算定数 K_4 が同定できることになる。

3. 前槽付き連続発酵槽におけるオンライン測定

以上のようにして導き出された方法を、前槽を持つ固定化酵母を充填した連続発酵槽におけるアルコール濃度のオンライン測定に適用した。実際に糖化液を用い、前槽容量1.5 l、リアクター容積0.563 l、ゲル容積30 mlとした場合の結果をFig. 7 に示した。この結果は前槽において適応制御、リアクターにおいてファジィ制御を行った結果である(第4章B.)。

前槽における1日毎の目標濃度を5 v/v% (39.5 g/l) とし、流出液の濃度が9 v/v% (71 g/l) となるようガス流量計からの入力値をもとに制御した。このため、前槽中の温度は10-20 °Cの範囲で変化し、リアクターにおいても希釈率と温度が刻々と変化している。

また、この時連続発酵槽中のアルコール濃度の推定式は前槽からのアルコール流入を伴うためこれを考慮する必要があった。

$$P_t = \exp\left(-\int_{t_0}^t D dt\right) \left\{ \int_{t_0}^t \exp\left(\int_{t_0}^t D dt\right) (K_2 V_{CO_2} / V + DP') dt + P_{t_0} \right\} \quad (11)$$

ここで、 P' は前槽中のアルコール濃度である。

Fig. 7 に示されるように、運転開始時に頻繁にアルコール濃度実測値を与えてやり換算定数を同定すれば、連続発酵槽の13番目のデータ以後のアルコール濃度推定値と実測値の差の平均は0.091%、その分散は0.139であり、実測値測定に使用したガスクロマトグラフィーの繰り返し精度は分散にして0.1137であ

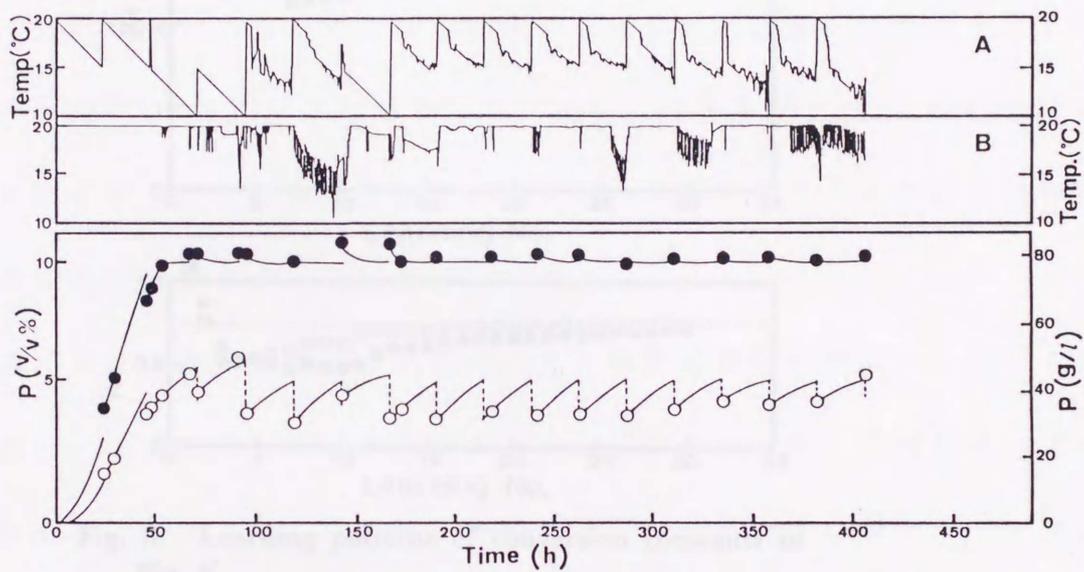


Fig. 7. On-line estimation of ethanol concentration in continuous fermentation with the pre-fermentor operated by the repeated fed-batch method. Solid lines are calculated results according to Eqs. (4), (8) and (11). Broken lines express the dilution by added saccharified solution. Symbols are measured values: \circ , pre-fermentor; \bullet , continuous fermentor. Temperatures in A indicate the pre-fermentor; temperatures in B indicate the continuous fermentor.

4. 濃度を伴った反応の学習

本方式は割合混合器の代りに反応器から導き出されたものを採用する。濃度による反応速度の変化は反応器の出口よりより一様な濃度であるが、濃度を伴った反応速度は濃度による変化を示す。濃度を伴った反応速度は濃度の異なる反応器と反応器を比較して、その反応速度を比較する。その結果、濃度を伴った反応速度は濃度の異なる反応器と反応器を比較して、その反応速度を比較する。

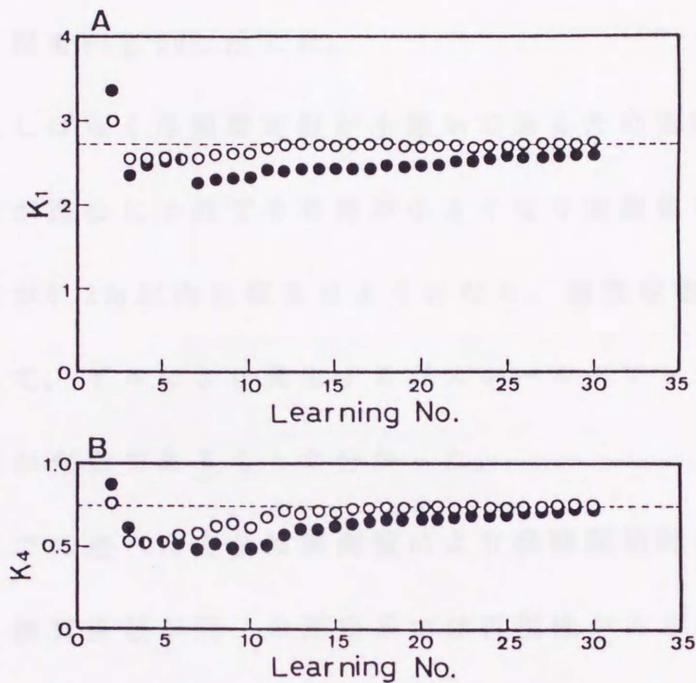


Fig. 8. Learning patterns of conversion constants in Fig. 6.

(A), pre-fermentor operated by the repeated fed-batch method. (B), continuous fermentor. The results were compared using the linear least squares method with intercept, ● and without intercept, ○. Broken lines are the convergent values.

4. 攪拌を行わない場合の測定

本方法は完全混合型の状態方程式から導き出されたものであり、実際によく使用される固定化酵母の充填型のリアクターに適用できるか否か、攪拌を伴わない装置にて本方法を適用してみた。攪拌を行わないこと以外はFig.7の実験結果と同様の条件にて行った。その測定結果をFig.9に、その時の換算定数の同定の過程をFig.10に示した。

開始後しばらくは換算定数が不確かであるため実測値との差は非常に大きい。同定が進むにつれてその差が小さくなり実測値を7回程度与えた頃にはほぼその差が0.2%以内に収まるようになり、換算定数 K_4 は 0.898 と求められた。したがって、ゲルにより発生するガスホールドアップのみの混合状態においても本方法が有効であることが分かった。

以上までに述べた方法は実測値により発酵開始時に校正するという条件付きであり、換算係数が同一の測定系では再現性があるが、発酵形式により影響を受けることによる。これらのことは溶存CO₂濃度と深く関わっていることが予想され、DCO₂センサー等で補正すればより正確なセンサーとなる可能性がありこの事は今後の課題である。また、本方法は、二酸化炭素の発生とセンサリングの対象となる成分の生成が比例関係にある場合、他の嫌氣的発酵生産にも有効であると思われる。

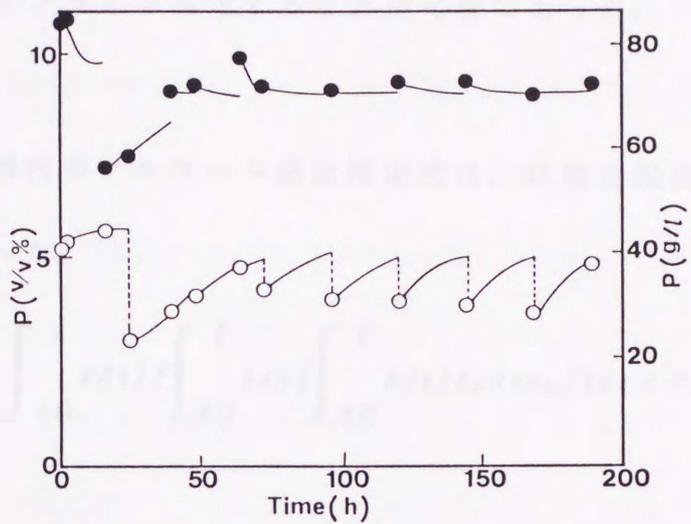


Fig. 9. On-line estimation of ethanol concentration in the continuous fermenter without agitation. Lines and symbols are the same as in Fig. 6.

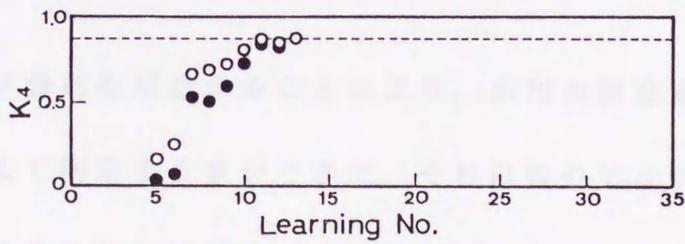


Fig. 10. Learning pattern of conversion constant of the continuous fermenter in Fig. 8. Symbols are the same as in Fig. 7.

要 約

1、二酸化炭素発生速度を監視することにより、連続発酵槽内のアルコール濃度を精度良くオンライン測定することが可能であった。

2、連続発酵槽内のアルコール濃度推定式は、状態方程式から導かれる、次の式によって行った。

$$P_t = \exp\left(-\int_{t_0}^t D dt\right) \left\{ \int_{t_0}^t \exp\left(\int_{t_0}^t D dt\right) K_2 V_{CO_2} / V dt + P_{t_0} \right\}$$

3、ガス流量をアルコール濃度に換算する定数は連続発酵において温度の影響を受けたため次の式で温度補償した。

$$K_2 = K_3 \log(T) + K_4$$

4、簡単な学習則を用意することにより、未知の換算定数を発酵中に10回程度実測値を与えて同定する事ができた。それ以降のアルコール濃度の推定値と計算値の差の平均は0.091%であり、その分散は0.139%であった。

記号

- D : dilution rate, $D = F / V$, 1/h
- F : feed rate of medium, l/h
- K : conversion constant in batch fermentor, g-ethanol/l-gas
- K_1 : conversion constant in pre-fermentor, g-ethanol/l-gas
- K_2 : conversion constant in continuous fermentor, g-ethanol/l-gas
- K_3, K_4 : constant
- P : ethanol concentration, g/l
- t : time, h
- t_0 : initial time, h
- T : temperature, °C
- V : volume of broth, l
- V_{CO_2} : CO₂ flow rate, l/h
- X : cell concentration of immobilized yeast and free yeast, g/l
- ν : specific ethanol production rate, g-ethanol/g-cell/h

B. 清酒連続醗酵システムのアルコール濃度のオンライン制御

本章 A では、質量流量計を用いる CO_2 ガス発生速度の監視により連続醗酵槽内のアルコール濃度を、精度良くオンライン測定する系を構築した。本測定系では、用意した簡単な学習即により、未同定の換算定数も、醗酵途中のアルコール濃度実測値の繰り返し代入（10 回程度）により推定可能であり、精度がさらに向上することを示した。

本連続醗酵システムでは、前槽にて常にアルコール濃度が変動しており、これがリアクターにおける恒常的な外乱要因となっている。また、制御の操作変数である温度と流速に関しても、それぞれ制約があり、極端な変更はできない。したがって、工程の自動化のためには、精度の良いアルコール濃度のオンライン測定系と共に、信頼性の高い制御器の設計が要求される。

そこで、本章 B では、本章 A で構築した質量流量計によるアルコール濃度のオンライン測定下に、前槽にて適応制御^{9, 10)}を行い、リアクターにてファジィ制御¹¹⁾を応用し、オンライン制御を行った。さらに、適応制御において、同定不能なパラメータをプロセスに合致した値に修正するために、ファジィ理論を応用した学習則を設けて制御性能を高めることを試みた。

実験材料と方法

使用菌株と培地

Saccharomyces cerevisiae Kyokai-701を用いた。糖化液と半合成培地の調製方法は第4章Aに従った。固定化酵母ゲルはKyokai-1001を用いて第2章の方法にて調製した。

オンラインアルコール測定方法

本章Aの方法を用い、質量流量計によりCO₂発生速度を測定し、これから前槽中とリアクター中のアルコール濃度を推定した。校正はガスクロマトグラフィーにてアルコール濃度を実測しつつ行った。

その他の分析

菌体濃度はOD₆₆₀を測定することにより代表させた。一般成分及び香気成分の測定は、第2章に従った。

装置

Fig.11 にその概略を示した。前槽として、1.6ℓ容ミニジャー（Biott社製D型）を使用し、リアクター容量は560mLとした。リアクターは温調可能な水槽中に沈めスターラーにて緩やかに攪拌した。この水槽温度はコンピューター

(PC-9801 RX21) からオンオフ制御により SSR (Solid State AC-Relay) を介して制御した。前槽温度は比例制御にてジャー側のコントローラで独立して行わせ、通液速度及び前槽温度の設定値は RS232C を介してコントローラと通信することにより行った。プログラムは MS-DOS 上の BASIC にて記述し、1 タスクの中で計測、制御、通信、データ学習及び割り込み許可などを時間管理したシーケンスを実行して実現した。

前槽における適応制御

第4章Aに示したように、24時間毎の糖化液投入直前の前槽中アルコール濃度は、糖化液投入量を一定にし、温度を一定条件に保てば、徐々に一定の値に近づくことがわかっている。したがって、投入直前のアルコール濃度をある目標値になるよう制御することで、前槽を安定化することが可能であると考えられた。

そこで、次に示した速度式^{12, 13)}を用いて適応制御を行った。

$$dX_P/dt = A_1 (-E_1/RT_P) (1 - X_P/X_m) X_P \quad (1)$$

$$dP_P/dt = A_2 (-E_2/RT_P) (1 - P_P/P_m) X_P \quad (2)$$

ここで、 X_P は前槽中菌体濃度、 P_P は前槽中アルコール濃度、 t は時間、 R は気体定数、 T_P は前槽内温度、各係数 A_1 、 A_2 は第4章Aに従い、 E_1 、 E_2 は佐藤らの報告¹⁴⁾に基づいた。また、 X_m 、 P_m は第4章Aの速度式をRunge-Kutta-Gill法を用い、前槽におけるアルコール濃度が3～5 v/v%の間で変動することを

前提として解き、これを近似するように決定し、速度式を簡単化した。それらの値は記号の項に示した。

適応制御を構築するにあたり以下の方法を使用した。式(1)、(2)を差分型にて整理し、式(3)に示した評価関数 J が最小となるように Newton-Raphson法にて菌体濃度 X_p を推定した。

$$J = \sum_{i=1}^n (p_i - p'_i)^2 \quad (3)$$

ここで、 p_i は i 時点での速度式による推定値であり、 p'_i は10分ごとの測定値である。 $n = 20$ とし、新しいデータが得られる度に最も古いデータを捨て去った。また、用いた質量流量計によるアルコール濃度推定値は、発生する炭酸ガスを積算し、アルコール濃度に換算する方法であるから、離散的にセンサーからデータをサンプリングする場合のようなばらつきが少なく、なめらかな測定値 p'_i が得られたので、フィルター¹⁵⁾ を設ける必要はなかった。

制御は菌体濃度 X_p を同定した後、設定した糖化液投入直前のアルコール濃度 5 v/v% になるように、Fig.12 に示した 0.5 °C 間隔の 21 の温度パターンの全てについて同定済みの菌体濃度 X_p を式(1)、(2)に与えて、菌体濃度同定時点から糖化液投入時点までのアルコール濃度を予測し、設定値のアルコール濃度に最も近くなる温度パターンを選択し、その時点まで使用していたパターンと取り替えることで行った。菌体濃度同定、予測の制御計算の周期は10分とした。

この温度パターンは、前槽への糖化液投入後から、24時間後の次の投入までの温度経過を表し、この単位期間中、25℃～10℃の範囲で、次第に下げられるように設定している。この理由は、糖化液投入から次の投入までの24時間を1サイクルとした場合、サイクルの前半は比較的高温で酵母増殖を促す必要があるが、長時間20℃以上の醗酵温度に保つことは品質上好ましくないこと、さらに、サイクルの後半は生成される香気成分をできるだけ低温度で保持する目的からこのように設定した。



Fig. 11. Control system for brewing.

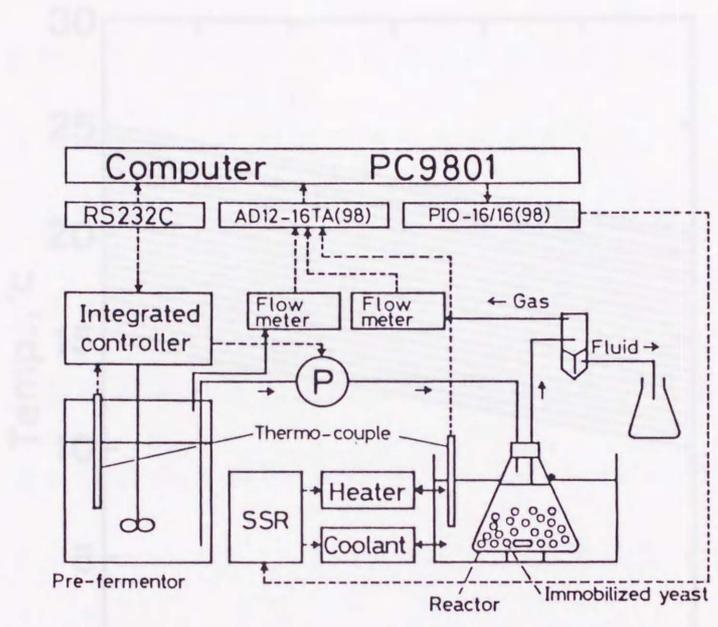


Fig. 11. On-line ethanol monitoring and control system for continuous sake brewing.

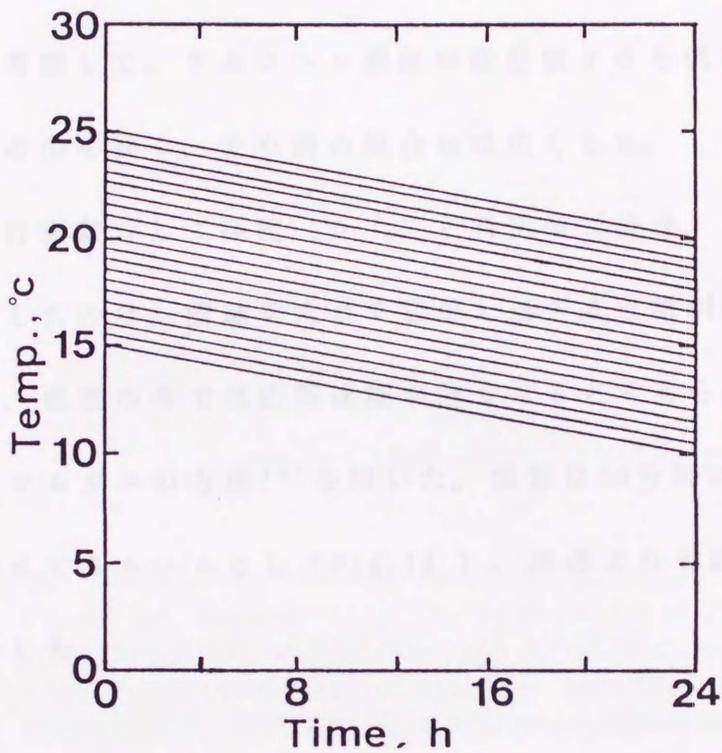


Fig.12. Temperature pattern used for adaptive control of the pre-fermentor. Lines indicate temperature patterns from an addition of saccharified rice solution to the next addition.

リアクターにおけるファジィ制御

ファジィコントローラー構築にあたり、第4章で報告した速度式を用いた。メンバーシップ関数 (Fig.13) は1変数当たり3つ設けた。入力としてその時点でのアルコール濃度 (制御量) と設定値の差 (P_R) と1制御サイクルにおけるアルコール濃度の変化量 ($\Delta P_R / \Delta t$) の2つとした。今回の特徴はアルコール濃度を低下させるのは比較的容易であるが、上昇させるときに応答が遅くなることを考慮して、アルコール濃度が設定値よりも低い場合には、メンバーシップ関数の巾を狭く、また逆の場合には広くした。

操作変数として温度 (ΔT_R) と希釈率 (流速、 ΔF) を採用した。二操作変数としたのは、流速を大きく変更し過ぎると原料供給量等の製造計画を狂わせ、また、温度のみでは応答速度が遅くなると考えられたからである。非ファジィ化はマムダニの方法¹⁶⁾を用いた。演算は10分毎に行なわせ、ルールは最小限度に抑えて9ルールとし (Fig.14)、流速よりも温度を優先的に操作するように設計した。

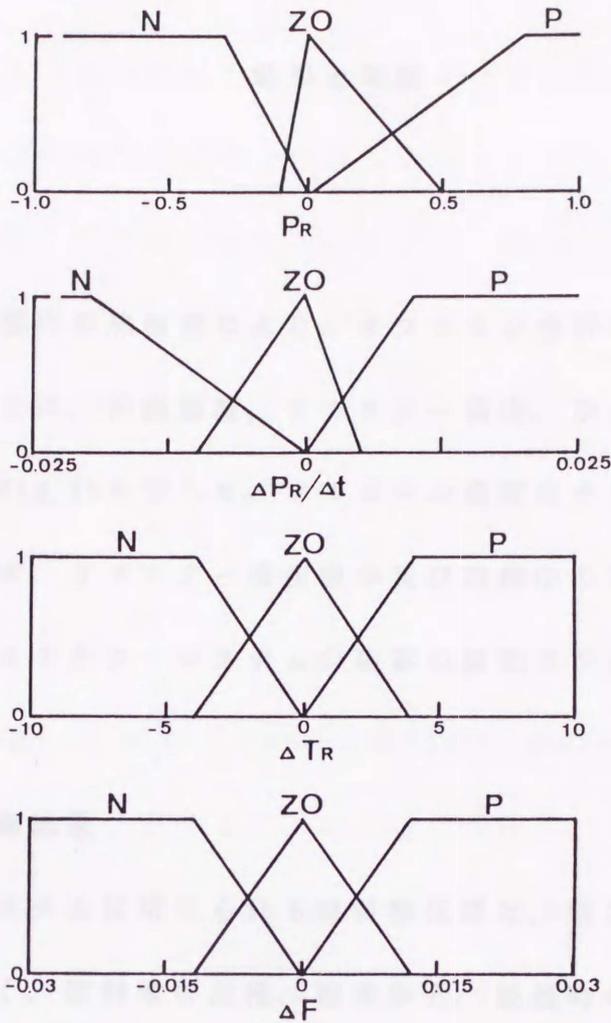


Fig. 13. Membership functions for P_R and $\Delta P_R / \Delta t$.

P_R , as the input variable, is the deviation of the setpoint value from the controlled variable, and $\Delta P_R / \Delta t$ changes during Δt . ΔT_R and ΔF , as the controlled variable, are temperature and feed rate, respectively. The linguistic states are expressed as N, negative; ZO, zero; and P, positive.

		$\Delta P_R / \Delta t$		
		N	ZO	P
P_R	N	$\begin{matrix} P \\ N \end{matrix}$	$\begin{matrix} P \\ N \end{matrix}$	$\begin{matrix} ZO \\ ZO \end{matrix}$
	ZO	$\begin{matrix} P \\ ZO \end{matrix}$	$\begin{matrix} ZO \\ ZO \end{matrix}$	$\begin{matrix} N \\ ZO \end{matrix}$
	P	$\begin{matrix} ZO \\ ZO \end{matrix}$	$\begin{matrix} N \\ P \end{matrix}$	$\begin{matrix} N \\ P \end{matrix}$

← ΔT_R

← ΔF

If P_R is P and $\Delta P_R / \Delta t$ is N
then ΔT_R is ZO and ΔF is ZO.

Fig. 14. Fuzzy ruled for control by ΔT_R and ΔF .

結果と考察

1. 手動制御結果

本リアクターの操作の熟練者により、オフライン分析により得られたアルコール濃度の値をもとに、前槽温度、リアクター温度、及び流速を適宜変更した手動制御の結果をFig. 15に示した。アルコール濃度をそろえるために手動制御したにもかかわらず、リアクター流出液中及び前槽中のアルコール濃度は一定しておらず、このリアクターシステムの応答の複雑さが示されていた。

2. オンライン制御結果

本リアクターシステムに用いられる原料糖化液は、第3章に示したように、糖化条件だけでなく、原料米の品種、精米歩合、製造時の汲水歩合等により、その成分が変化する。糖化液の成分変化と共に、酵母の発酵特性が変動し、さらに、用いられる酵母が変更されることもありうる。また、リアクター運転に先立って、採用した酵母と糖化液を用いて製造現場でその都度、パラメータを同定するにしても、その作業はかなりテクニカルなものである上、貯蔵上の問題から糖化液製造はリアクター運転直前に行われるため時間的な制約を受ける。さらに、連続発酵という装置形式ではあるが、原料糖化液は回分式に製造され、連続運転の全期間を通じて同一のバッチにて製造された糖化液となることは無く、若干の成分のばらつきは避けられないと思われる。

そこで、本制御系の原料培地の成分変動に対する信頼性を確認することを目的として、速度式を作成した条件とは異なる環境を意図的に作り出すために、培地中の窒素源濃度としては、本章 A の 1 / 5 の濃度のものを用いた。

Fig. 16 にその制御結果を示した。この時、作成したコントローラーの精度は、リアクターにおいて実測値（ガスクロ分析値）との差が 0.2 v/v% 以内であり、前槽では糖化液投入直前のアルコール濃度設定値に対し、0.05 v/v% 以内に制御することができた。

Table 1 に 1 日に得られる流出液を合併した、11 日間の製成酒の成分分析を行った結果を示した。アルコール濃度は流出後、後醗酵を行ったため設定値（8 v/v%）より少し上昇しているが、いずれの項目についてもほぼ一定した値であり、安定した成分の製成酒を連続醸造することが可能であった。

Fig. 16 において、リアクター設定温度及び流速は、本章 A で報告したセンサーの校正のために与えた実測データ（これほど頻繁に与える必要はない）により、変化量が大きいと判断したために過渡的に応答しているものの、それ以外わずかな操作量で制御した。また、糖化液投入から 24 時間後の投入までの間に、前槽のアルコール濃度の変動に対応するため、流速とリアクター温度は微妙に変化した。

一方、前槽における温度制御値の結果は、温度を次第に下げていくという設定にもかかわらず、糖化液投入直後に大きく上昇する傾向と、後半横ばい傾向にあるという 2 つの特徴がみられた (Fig. 16 A)。前者の原因として以下のこ

とが考えられた。

糖化液投入による酵母増殖の一時的なラグタイムにより、投入直後のアルコール生成速度が小さくなり、その実測データ群をもとに推定された菌体濃度は、式(1)、(2)ではラグタイムを考慮していないので、実際よりも小さくなる。そして、次のステップで、この時推定された菌体濃度をもとに、式(1)、(2)を使用して目標のアルコール濃度を達成し得る温度パターンを決定した結果、必要以上に高い温度パターンを選択してしまった。その後、菌体が糖化液投入後の新しい環境に対応し、再び発酵を開始するに伴って、菌体濃度同定のためのデータ数 $n = 20$ の中にラグタイム時のデータが少なくなるにつれて、温度を下げていくという結果となったと考察された。

したがって、この解決策として、ラグタイムを考慮した酵母増殖の速度式を採用することが考えられるが、この糖化液投入直後に温度が大きく上昇する現象は、ラグタイムを短縮するという理由から、ある程度容認することができると思われた。

しかし、後者の現象はラグタイム後から、後半にかけて高いパターンへ次第にシフトしており、温度を次第に下げるという制御方策からはずれ、後半にかけて香氣成分を保存するという当初の品質保全上の目的に反する。

後者の現象は、ラグタイム終了後に温度を下げすぎたためであるが、その根本的な理由は、速度式中のパラメータを決定した培地条件よりも低い窒素源濃度の培地を意図的に用いたため、実際に酵母が示す増殖及び発酵速度よりも、

式(1)、(2)により計算される速度が大きいためであると考えられた。すなわち、式(1)~(3)より、菌体濃度を推定した後、Fig. 12中の各温度パターンごとに予測されるアルコール濃度を計算する際、式(1)により計算される菌体増殖量は実際よりも大きいため、目標のアルコール濃度を達成する温度パターンが実際よりも低く選択されてしまったものと考えられた。その後、目標までの残り時間が減少し、菌体濃度は計算結果ほどは増殖しないので、低いパターンでは目標を達成できないということになり、次第に温度パターンを高い方へシフトしていったと考えられた。

この解決策として、式(1)中の係数 A_1 をプロセスの示す本来の値へと適応させ、より確からしい菌体濃度を推定し、正確な予測を行い適切な温度パターンを選択することで後半の温度上昇を抑えることを意図した。まず、適応制御の演算中で菌体数 X_p と係数 A_1 を同時に適応させることが考えられるが、アルコールの入力値のみを用いて、すでに菌体数を推定しているわけであり、真の菌体増殖がわからない限り式(1)中の2つのパラメーターを同時に推定することは、かえって温度の上下を招くことが予想された。

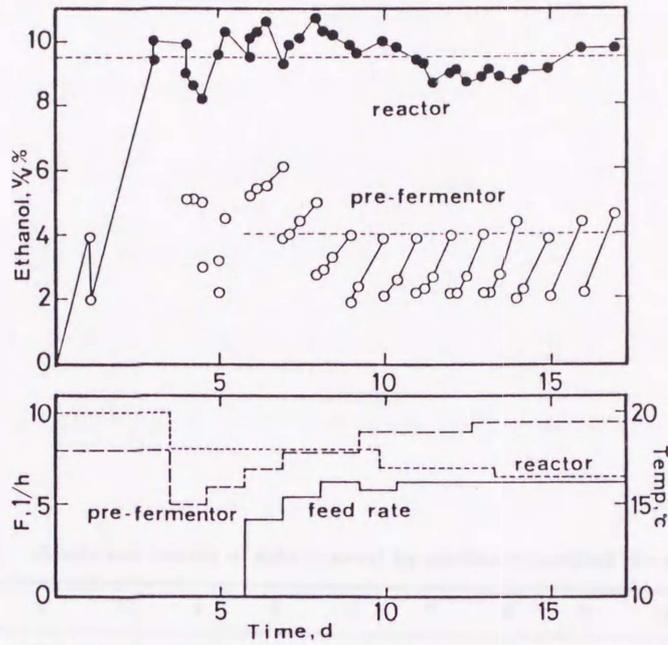


Fig. 15. Typical time-course by off-line control.
 Symbols: ●, reactor; ○, pre-fermentor. Lines:
 - - - - - , temperature of reactor; - - - - - ,
 temperature of pre-fermentor; ——— , feed
 rate to reactor.

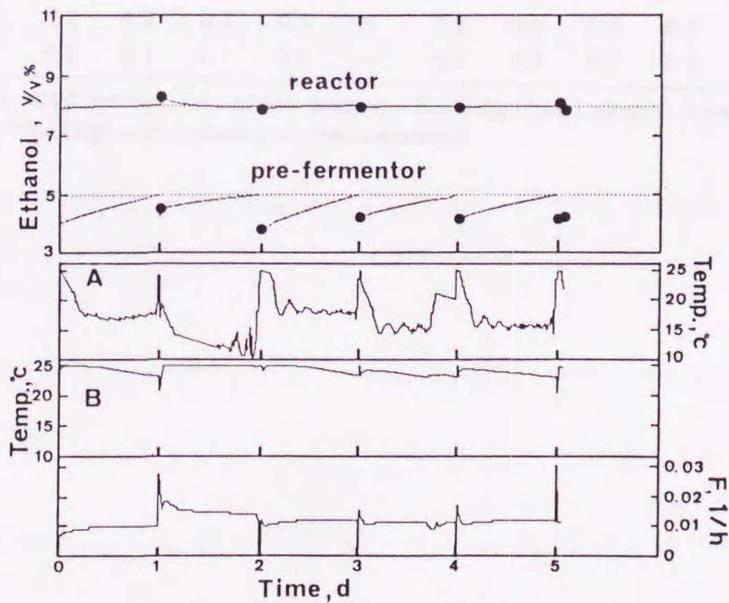


Fig. 16. Control result.

In the ethanol concentration, broken lines are setpoint values and solid lines are controlled values. Temperatures A and B indicate the setpoints decided at the pre-fermentor and at the reactor, respectively. F indicate the feed rate from the pre-fermentor to the reactor.

3. オンライン制御によるバイオリアクター醸造

一試本から11試本が醸造された。醸造は常法で行われ、酵母は本醸造の製法に従って、
 醸造温度は15°Cに設定された。醸造は常法で行われ、酵母は本醸造の製法に従って、
 醸造温度は15°Cに設定された。

醸造温度を15°Cに設定して醸造を行った。醸造は常法で行われ、酵母は本醸造の製法に従って、
 醸造温度は15°Cに設定された。

Table 1. Analytical results of sake brewed by on-line controlled bio-reactor.

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	X	δ
OD ₆₆₀	13.9	13.1	12.7	12.0	12.3	11.7	10.6	12.7	13.5	13.5	13.0	12.61	0.901
Ethanol (v/v%)	8.2	8.4	8.2	8.3	8.2	8.4	8.1	8.1	8.2	8.0	8.1	8.18	0.135
DS (w/v%)	5.5	5.6	5.6	5.3	5.5	5.9	5.5	5.6	5.6	5.6	5.5	5.56	0.126
TA (ml)	2.30	2.30	2.25	2.30	2.25	—	2.15	2.10	2.10	2.10	2.10	2.20	0.088
AA (ml)	0.10	0.10	0.15	0.10	0.10	—	0.15	0.10	0.15	0.10	0.10	0.12	0.023
i-ButOH (ppm)	33.9	32.2	34.2	34.1	35.3	—	36.6	35.5	39.4	37.8	37.8	35.68	2.09
i-AmOH (ppm)	128	139	137	139	140	—	154	134	136	128	123	135.8	8.13
i-AmOAC (ppm)	0.3	0.3	0.2	0.3	0.5	—	0.4	0.4	0.5	0.6	0.6	0.40	0.13
Etyl-Cap (ppm)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.19	0.09

DS, reducing sugar; TA, total acidity; AA, amino acidity; i-ButOH, i-butyl alcohol; i-AmOH, i-amyl alcohol; i-AmOAC, i-amyl acetate; Etyl-Cap, etyl caproate; —, not measured.

3. ファジィ学習則によるパラメータ推定

清水ら¹⁷⁾はパン酵母の反復流加培養において、モデル規範学習制御を用いて軌道追従の精度を高めることを報告している。ここでは、ファジィ理論を用いて次のような学習制御を試みた。

増殖速度式(1)を正しく適応させるために、まず次の点に着目した。前槽運転の原料投入から原料投入までの1サイクル当り幾つのパターンを使用したのか、またそのサイクルの中でラグタイム終了後選択するパターンは上昇傾向にあるのかあるいは下降傾向にあるのかということである。例えば、低いパターンから高いパターンへと大きくシフトし、パターン使用総数が多くなり、上昇傾向にあるという結果が得られたとする。この事はサイクル初期に菌体増殖を過大評価し、発酵が早く進行するという演算結果にもとずき、低い温度パターンでも目標に達するという誤った判断から生ずる結果であるから、式(1)中の A_1 の値を小さくしてやればよい。すなわち、このことによりパターン使用総数を減らし、パターンの上昇も下降もみられない状態へ近づけていくことができると考えられた。

この学習則はファジィ理論を応用して構成し、そのメンバーシップ関数をFig. 7に示すが、DPはラグタイム(4時間とした)後のサイクルの中で使用した最大の温度パターンと最小の温度パターンの差であり、NPは使用したパターンの総数を示す。また、 k は式(1)中の A_1 に乘じる修正係数であり、次式のように修正した。

$$A_1(j) = A_1(j-1)k_j \quad (4)$$

ここで、添え字 j はサイクルの回数を表す。ルールは Fig. 18 に示し、9 ルールとした。演算は各サイクルの終了時に行った。

以上示した学習則を設けた制御結果を Fig. 19 に示した。この制御実験では糖化液を用いた。また、前回の制御よりもさらに操作条件を厳密にするために温度パターンの数を減少させ、サイクルの出発温度が 20 度以下の 11 のパターンのみを用いた。

Fig. 19 中の前槽温度設定値の結果は Fig. 16 のそれより改善がみられ、若干の振動がみられる以外はパターンの傾向を忠実に反映した右肩下がりの結果であり、使用した温度パターンの総数も減少し、作成した学習則がほぼその目的を達成したことが確認できた。したがって、この方法によりアルコールのみを測定することで、式 (1) 中の係数 A_1 を修正することにより酵母が糖化液中で示す正味の増殖速度を推定し、アルコール生成を制御することができた。

また、流速とリアクター温度にハンチングが生じたが、これは Fig. 13 中の演算出力 (ΔT_R , ΔF) のメンバーシップ関数の巾を変更すれば容易に解決可能であると考えており、数学モデルを用いたシミュレーションによりそのことは確認されている。

Table 2 に Fig. 19 のオンライン制御を行った製成酒とパイロットスケールでのオフライン制御にて醸造された製成酒を比較した官能結果を示した。単純に比較はできないが結果をみる限り有意差は認められず本制御が官能に耐え得

る清酒を醸造できることがわかった。今後、香気や味覚の面からの研究を重ねていく必要があるであろう。



Fig. 11. — Relationship between pH and time for strains A, B, and C. The figure shows the pH of the medium during the fermentation of the yeast strains A, B, and C. The pH of the medium is measured at intervals of 10 minutes. The pH of the medium is measured at intervals of 10 minutes. The pH of the medium is measured at intervals of 10 minutes.

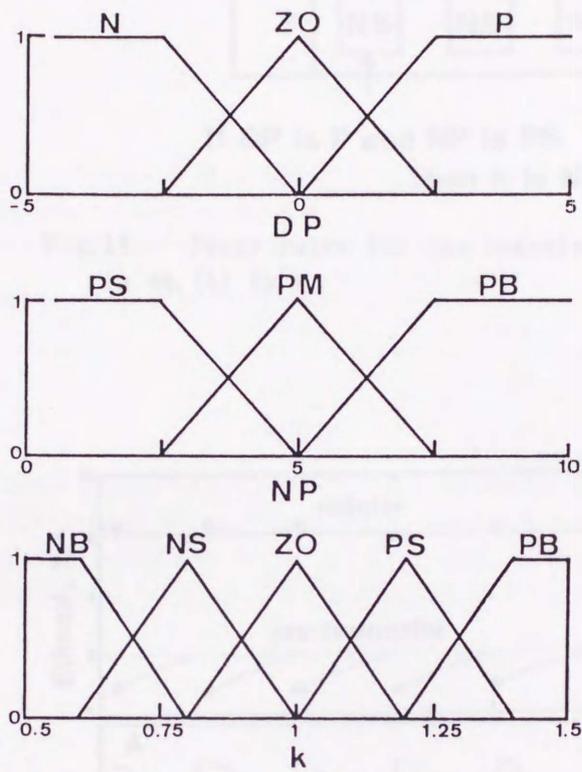


Fig. 17. Membership function for DP, NP, and k. The linguistic states are expressed as S, small; M, medium; and B, big. The other states are the same as in Fig. 13. DP is the difference of the maximum and minimum patterns of temperature used for adaptive control at the pre-fermentor. NP is the number of patterns used.

		PS	NP PM	PB
D P	N	PS	PB	PB
	ZO	ZO	ZO	ZO
	P	NS	NB	NB

If DP is P and NP is PS
then k is NS.

Fig. 18. Fuzzy rules for the learning of constant A_1 in eq. (1) by k.

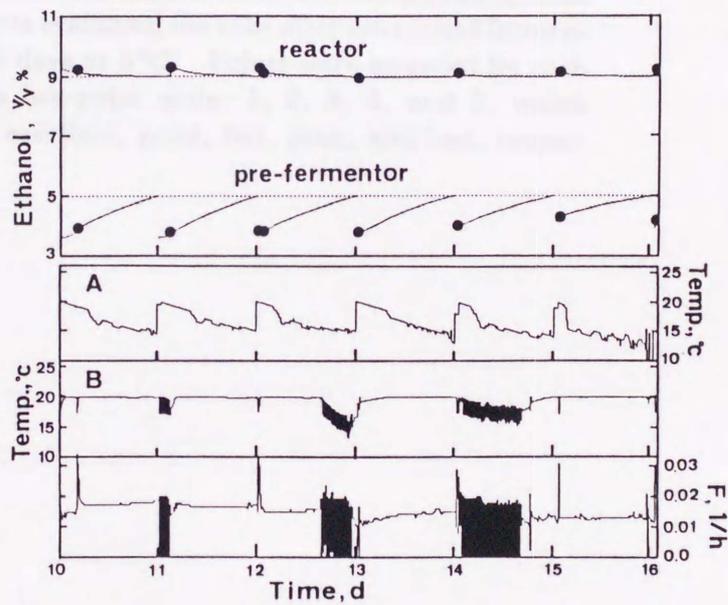


Fig. 19. A control result.
Symbols and lines are the same as in Fig. 16.

Table 2. Sensory evaluation of sake brewed by on-line or off-line control.

Control	Sensory evaluation	
	Flavor	Taste
Off-line	2.11	2.22
On-line	2.44	2.44

9 panellists evaluated the sake after the second fermentation for 5 days at 5°C. Points were awarded by each judge on a five-point scale: 1, 2, 3, 4, and 5, which designated excellent, good, fair, poor, and bad, respectively.

要 約

1、質量流量計によるアルコール濃度推定下に、前槽は適応制御で、また、固定化酵母リアクターはファジィ制御で、それぞれ運転するオンライン制御システムを構築し、前槽中の糖化液投入直前の、アルコール濃度の目標値に対して0.05%以内に、また、リアクター内のアルコール濃度を設定値の0.2%以内に、それぞれ制御できることを示した。

2、前槽内温度経過に生じる若干の乱れの調整に必要な酵母増殖速度式中のパラメーターは、ファジィ理論により作成した学習即を用いて求めた。

記 号

- A_1 : frequency factor of cell growth, 3.27×10^{14} /h
- A_2 : frequency factor of ethanol production, 9.47×10^9 /h
- DP : difference of temperature pattern between max. and min., °C
- E_1 : activation energy of cell growth, 85800 J/mol
- E_2 : activation energy of ethanol production, 56500 J/mol
- F : feed rate to reactor, 1/h
- ΔF : controlled amount of feed rate to reactor, 1/h
- J : objective function, $(g/l)^2$
- k : output variable of fuzzy learning, -
- n : number of data st adaptive control, -
- NP : number of the used temperaure pattern, -
- P_i : i th ethanol concentration caluculated by eq. (1) and eq. (2), g/l
- P'_i : i th measured ethanol concentration, g/l
- P_m : constant, 66.44 g/l
- P_p : ethanol concentration in pre-fermentor, g/l
- P_R : difference of ethanol concentration in reactor between setpoint value and controlled variable, v/v%
- ΔP_R : difference of ethanol concentration for Δt in reactor, v/v%

R : gas-law constant, J /mol/K

T_P : temperature in pre-fermentor, K

T_R : temperature in reactor, °C

ΔT_R : controlled amount of temperature in reactor, °C

t : time, h

Δt : control interval, 10min

X_m : constant, 2.54 g/l

X_P : cell concentration in pre-fermentor, g/l

文 献

- 1) 佐藤和夫、近藤恭一、太田剛雄、吉沢淑、中村欽一 ; 醸協, 80, 553-558
(1985)
- 2) 近藤恭一、元吉徹、三島秀夫、竹村成三、佐藤和夫、吉沢淑 ; 醸協, 81,
810-814 (1986)
- 3) 近藤恭一、三島秀夫、竹村成三、佐藤和夫、吉沢淑 ; 醸協, 83, 416-419
(1988)
- 4) 大石 薫、富永光則、川戸章嗣、安部康久、杉並孝二、今安 聰 ; 醱酵工学,
68, 475-481 (1990)
- 5) 今安 聰、杉並孝二 ; 特許、昭 49-25360
- 6) 柴田正人 ; 醱酵工学, 57, 445-452 (1979)
- 7) 杉本芳範、田中伸哉、古川彰久、渡辺和夫、吉田敏 臣、田口久治 ; 醸協,
82, 205-210 (1987)
- 8) Luedeking, R., Piret, E. L. ; *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.*, 1, 393-412
(1959)
- 9) Montague, G. A., Morris, A. J., Wright, A. R., Aynsley, M. and Ward, A. C. : *IEE
PROCEEDINGS*, 133, 240-246 (1986)
- 10) 大石 薫、富永光則、川戸章嗣、安部康久、今安 聰 : 醱酵工学, 68, 483-491
(1990)

- 11) Nakamura, T., Kuratani, T. and Morita, Y.: Proc. of 1st IFAC Sympo. on Modelling and Control of Biotechnological Processes, 211 (1985)
- 12) Lee, J.M., Pollard, J.F. and Coulman, G.A.: *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 497-511 (1983)
- 13) Ghose, T.K. and Tyagi, R.D.: *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 1401-1420 (1979)
- 14) 佐藤和夫、宇都宮仁、近藤恭一、三島秀夫、竹村成三、吉沢 潔 : 醗酵工学、68, 25-29 (1990)
- 15) 片山 徹 : 応用カルマンフィルター、71-90、朝倉書店 (1983)
- 16) 水本雅晴 : *Computer Today*、5、11-16 (1988)
- 17) 清水和幸、山田芳和、飯島信司、小林 猛 : 化学工学協会年会研究発表講演要旨集、88 (1988)

第 6 章

総 括

酒類醸造業界の最大懸案事項は、醸造工程の合理化による製造原価の低減と、新規な酒類の開発による酒類消費量の増大である。本研究は、このような背景のもとで、バイオリアクターの導入による清酒醸造工程の自動化、並びに新品質の製品開発の可能性を検討した。すなわち、第 1 章では、まず、清酒醸造の技術的現状を分析し、これにバイオリアクターを導入することの意義、及び関連する当面の問題点を考察した。

第 2 章は、清酒の連続醸造に不可欠な雑菌汚染対策の確立に関するものである。米粉糖化液を用いた実験室規模のモデル系において、糖化液貯留用の前槽中に、固定化酵母リアクターから遊離する多量の酵母をプールして予備醗酵させ、前槽液中のアルコール濃度を 4 % 以上に保つことにより、pH 未調整の無殺菌糖化液を醗酵原料として、本リアクターを、長期間、安全に運転することを可能にした。

第 3 章では、白米を原料として本連続醗酵系のスケールアップと最適運転条件を検討し、①前槽中の遊離酵母を高濃度 (10^8 /ml) に保つこと、及び、②前槽中の溶存酸素濃度を、酵母の増殖を許容する最小限度 (0.01 ppm) の嫌気条件に制限することにより、良好な風味を持つ清酒製品を収率よく生産できるこ

とを示した。

なお、本連続醗酵系による製品は、爽快な酸味を持つアルコール濃度10～12%の新しいタイプの清酒である。これに関連して、焼酎用麴の味醂製造への応用により、爽快な酸味と濃厚な風味を持つ新しいタイプの味醂が得られることを示し、爽快な酸味の付与が、新規酒類開拓の一つの方向であることを示唆した。

第4章は、清酒の連続醗酵の動力学的検討に関するもので、まず、前槽中の遊離酵母の増殖及び醗酵速度式、糖及びアルコールの固定化酵母ゲル中の拡散抵抗等を考慮した通常モデル、及び、活性係数という新しい概念を用いて簡素化したモデルについて、本連続醗酵系の運転で得られる実測値との整合性を検討し、この簡素化モデルにより良好なシミュレーションが可能であることを検証した。また、このモデルを用いてシステムの操作条件と必要な装置容量が算出できることを示した。

次に、ニューラルネットワークの一つであるバックプロパゲーションを用いて、回分式アルコール醗酵における菌体濃度のシミュレーターを構築した。このシミュレーターでは、学習の際の入力値および教師信号をファジイ化するので、高いロバスト性を示し、未学習の入力値に対しても実測値に近い出力を行う。

第5章は、本バイオリアクターシステムのオンライン計測および制御に関するものである。まず、質量流量計を用いるCO₂ガス発生速度の監視により、連

続醗酵槽内のアルコール濃度を、精度良くオンライン測定する系を構築した。

本測定系では、用意した簡単な学習則により、未同定の換算定数も、醗酵途中のアルコール濃度実測値の繰返し代入（10回程度）により推定可能であり、精度がさらに向上する。

次に、質量流量計によるアルコール濃度測定下に、前槽は適応制御で、また、固定化酵母リアクターはファジイ制御で、それぞれ運転するオンライン制御システムを構築し、前槽中のアルコール濃度を目標値に対して、0.05%以内に、また、リアクター内のアルコール濃度を設定値の0.02%以内に、それぞれ制御できることを示した。なお、前槽内温度経過に生ずる若干の乱れの調整に必要な酵母増殖速度式中のパラメーターは、ファジイ理論により作成した学習則を用いて求めた。

以上の検討結果を総括することにより、固定化酵母リアクターと、多量の遊離酵母を含む前醗酵槽を結合したバイオリアクターシステムの開発が、爽快な酸味を持つ新規タイプの低アルコール清酒の、安定な連続生産を可能にした。

さらに、質量流量計を用いたアルコール濃度のオンライン測定系の開発が、本バイオリアクターシステムの、オンライン制御を可能にした。すなわち、清酒醸造工程の自動化、並びに新品質の製品開発という懸案事項に対して、本バイオリアクターシステム導入の有用性を指摘した。今後は、従来の伝統的な清酒醸造法と共に、自動制御化されたバイオリアクターを利用した、新しい清酒の連続醗酵法が、発展していくものと期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり終始御懇篤なる御指導と御高配を賜りました広島大学工学部 岡 智教授、並びに本論文の御校閲を賜った広島大学工学部 新見 治教授、永井史郎教授、大竹久夫教授、小埜和久助教授に深甚なる謝意を表します。

本研究は大関株式会社総合研究所において行われたものであり、この間、研究の遂行に格別の御理解と御高配を賜りました大関株式会社 長部文治郎社長、長部二郎副社長、堀江雅博常務取締役、並びに終始御指導頂きました常務取締役総合研究所長布川彌太郎博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究の全般にわたり、直接御指導と御鞭撻を頂いた本馬健光氏、浜地正昭氏、仲田富士男氏、松浦一雄氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、実験に御協力頂いた松岡淑恵氏、橋田恵子氏、竹崎道代氏、また種々御支援を頂きました製造部第1課の皆様にも厚く御礼申し上げます。

1) 固定化酵母を用いた米糖化液の連続醗酵

広常正人、仲田富士男、浜地正昭、本馬健光、

日本醸造協会雑誌 第82巻 第8号 582-586(1987)、(第2章)

2) 固定化酵母による清酒の連続醗酵

広常正人

日本醸造協会誌 第85巻 第1号 13-19(1990)、

Production of soft type sake by an immobilized yeast reactor system.

Y. Nunokawa and M. Hirotsune

Industrial Application of Immobilized Biocatalysts.(1992) in press

(第3章)

3) しょうちゅうこうじを用いたみりんの製造

布川彌太郎、椎木 敏、広常正人、

日本醸造協会雑誌 第77巻 第2号 123-125(1982)、(第3章)

4) 清酒の連続醗酵に関する動力学的研究

松浦一雄、広常正人、仲田富士男、浜地正昭、

醱酵工学会誌 第69巻 第5号 345-354(1991)、(第4章)

5)ニューラルネットワークによるアルコール醱酵プロセスの菌体濃度の同定

松浦一雄、広常正人、仲田富士男、浜地正昭、

醱酵工学会誌 第69巻 第6号 463-469(1991)、(第4章)

6)連続醱酵における質量流量計を使用したアルコール濃度のオンライン測定)

松浦一雄、広常正人、仲田富士男、浜地正昭、

醱酵工学会誌 第69巻 第5号 355-362(1991)、(第5章)

7)清酒の連続醱酵におけるオンライン制御

松浦一雄、広常正人、仲田富士男、浜地正昭、

醱酵工学会誌 第69巻 第6号 455-461(1991)、(第5章)